

# **Untersuchung der Dynamik von Mitochondrien mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden**

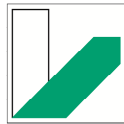
## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**- Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) -**

der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und  
Naturwissenschaften (BayNAT)

der Universität Bayreuth



vorgelegt von

**Dirk Scholz**

aus Dresden

Bayreuth

2014

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Die experimentellen Forschungsarbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Zeit von August 2009 bis Februar 2014 an der Universität Bayreuth am Institut für Zellbiologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Benedikt Westermann durchgeführt.

Dissertation eingereicht am: 12.08.2014

Zulassung durch das Leitungsgremium: 03.09.2014

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 12.12.2014

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Franz X. Schmid

Prüfungsausschuss:

Erstgutachter: Prof. Dr. Benedikt Westermann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stefan Schuster

weitere Prüfer: Prof. Dr. Matthias Weiss (Vorsitz)

PD Dr. Stefan Geimer



**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>iv</b>
<b>Summary</b>	<b>vii</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Ursprung, Struktur und Funktionen von Mitochondrien	1
1.2. Mitochondriale Dynamik in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.2.1. Transport und Vererbung von Mitochondrien	9
1.2.2. Die mitochondriale Fusion	11
1.2.3. Die mitochondriale Teilung	13
1.3. Mitochondrien in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
1.4. Zielsetzung	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1. Verwendete Organismen und Kultivierungsbedingungen	20
2.1.1. Hefestämme	20
2.1.2. Algenstämme	21
2.2. Plasmide, Primer und Klonierungsstrategien	22
2.3. Fluoreszenzmikroskopie	26
2.3.1. Generelle Bedingungen, Mikroskope und Zubehör	26
2.3.2. Photokonversion des Fluoreszenzproteins Dendra2	26
2.3.3. MitoTracker-Färbung von Mitochondrien in <i>C. reinhardtii</i>	27
2.3.4. FRAP-Experimente in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	27
2.4. Elektronenmikroskopische Methoden	28
2.4.1. Präparation und Einbettung von Hefezellen	28
2.4.2. Standardelektronenmikroskopie und Elektronentomographie	28
2.4.3. Cryo-Elektronenmikroskopie	29
2.5. Bioinformatik, Bildbearbeitung und Software	29

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>30</b>
<b>3.1.</b>	<b>Herstellung von Plasmiden zur Fluoreszenzmarkierung zellulärer Strukturen in <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>30</b>
3.1.1.	Mitochondriale Reporterkonstrukte mit mCherry als Fluoreszenzmarker	30
3.1.2.	Visualisierung der Dynamik von Mitochondrien und mitochondrialen Nukleoiden in <i>S. cerevisiae</i> mit Hilfe der Photokonversion von Dendra2	32
3.1.3.	Herstellung von Gateway-Plasmiden mit den Fluoreszenzmarkern mEos2, Dendra2 und E2-Crimson	37
3.1.4.	Plasmide für die genomische Markierung von ORFs im Genom von <i>S. cerevisiae</i> mit Dendra2	39
3.1.5.	Markierung von Dnm1 mit einem rot fluoreszierenden Protein	41
<b>3.2.</b>	<b>Untersuchungen zur Rolle von Dnm1 bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran</b>	<b>43</b>
3.2.1.	Diskontinuität der mitochondrialen Matrix an der Dnm1-Bindestelle	43
3.2.2.	<i>DNM1</i> <sup>G312D</sup> und <i>dnm1</i> <sup>G185S</sup> : Mutationen von <i>DNM1</i> homolog zu <i>shibire</i> <sup>ts</sup> aus <i>Drosophila melanogaster</i>	46
3.2.3.	Ultrastrukturelle Untersuchung möglicher mitochondrialer Teilungsereignisse in <i>DNM1</i> -, <i>DNM1</i> <sup>G312D</sup> - oder <i>dnm1</i> <sup>G185S</sup> -exprimierenden Zellen	50
<b>3.3.</b>	<b>Das kortikale Protein Num1: mitochondriale Dynamik und Zellarchitektur</b>	<b>55</b>
3.3.1.	Ultrastrukturelle Charakterisierung mitochondrialer Verankerungsstellen innerhalb der Retentionszone der Mutterzelle	55
3.3.2.	Untersuchung zur Beteiligung von Eisosomen an der Verankerung von Mitochondrien	59
3.3.3.	Bestimmung der biologischen Funktion der durch Num1 vermittelten Verankerung von Mitochondrien	65
<b>3.4.</b>	<b>Mitochondriale Fusion in Zygoten von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	<b>69</b>
3.4.1.	Beschreibung der Mitochondrienmorphologie in wildtypischen vegetativen Zellen und Gameten	69
3.4.2.	Fusion der Mitochondrien in Wildtypzygoten	71
3.4.3.	Mitochondriale Morphologie und Fusion in respiratorischen Mutanten	75
<b>4.</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick</b>	<b>82</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>

<b>6. Anhang</b> .....	<b>99</b>
<b>Publikationen</b> .....	<b>100</b>
<b>Erklärungen</b> .....	<b>101</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>102</b>

## Abkürzungen

Abf2-Dendra2	Fusionsprotein bestehend aus dem DNA-bindenden Verpackungsprotein Abf2 und dem Fluoreszenzprotein Dendra2
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenzkassette
AOFT	akustooptisch regelbarer Filter ( <i>acusto-optic tuneable filter</i> )
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenikolresistenzkassette
DIC	differentieller Interferenzkontrast
EM	Elektronenmikroskop(ie)
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERMES	Proteinkomplex, bildet Kontaktstellen zwischen endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien ( <i>ER-mitochondria encounter structure</i> )
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
IBM	innere Grenzmembran ( <i>inner boundary membrane</i> )
mt <sup>+</sup> /mt <sup>-</sup>	Paarungstypen ( <i>mating type</i> ) von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
mtDendra2	Fusionsprotein aus Dendra2 mit einer mitochondrialen Präsequenz
mtGFP	Fusionsprotein von GFP mit einer mitochondrialen Präsequenz
mtmCherry	Fusionsprotein bestehend aus mitochondrialer Präsequenz und mCherry
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PH	Pleckstrin-Homologie
ROI	Region/Bereich von Interesse ( <i>region of interest</i> )
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
WD40	Strukturmotiv von Proteinen, besteht aus ca. 40 Aminosäuren und endet häufig mit Tryptophan (W) und Asparaginsäure (D)
WT	Wildtyp
yEmRFP-Dnm1	Fusionsprotein bestehend aus einem auf Hefe adaptierten rot fluoreszierenden Protein und Dnm1
YPD/YPG	Hefenährmedium aus Hefeextrakt und Pepton mit Glukose bzw. Glycerin als Kohlenstoffquelle

## Zusammenfassung

Mitochondrien sind hochdynamische Organellen, die in vielen verschiedenen Zelltypen regelmäßig miteinander fusionieren und geteilt werden. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist ein idealer Modellorganismus, welcher sehr gut für die Untersuchung der mitochondrialen Dynamik geeignet ist.

Durch die Verwendung moderner licht- und elektronenmikroskopischer Methoden wurden in dieser Arbeit verschiedene Aspekte der mitochondrialen Dynamik in *S. cerevisiae* untersucht. Nach Herstellung einer Sammlung verschiedener mitochondrialer Markerplasmide konnte mit Hilfe des photokonvertierbaren Fluoreszenzproteins Dendra2 ein Assay etabliert werden, der es ermöglicht, die Dynamik individueller Mitochondrien innerhalb einer Zelle spezifisch zu verfolgen. Das Dynamin-verwandte Protein Dnm1 ist in *S. cerevisiae* die Schlüsselkomponente der mitochondrialen Teilung. Es ist jedoch nicht bekannt, ob Dnm1 ausschließlich die Teilung der mitochondrialen Außenmembran vermittelt oder es ebenfalls für die Teilung der mitochondrialen Innenmembran verantwortlich ist. Proteine, welche die Teilung der mitochondrialen Innenmembran vermitteln, sind bisher unbekannt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Dnm1 möglicherweise an der Teilung der mitochondrialen Innenmembran beteiligt ist. In Kombination mit fluoreszenzmarkierten Dnm1-Varianten konnte mittels Photokonversionsassay gezeigt werden, dass an den Assemblierungspunkten von Dnm1 und Dnm1<sup>G185S</sup> eine Diskontinuität innerhalb der mitochondrialen Matrix vorhanden ist. Bei ultrastrukturellen Analysen möglicher Dnm1-Bindestellen wurden gegenüberliegende Cristae oder getrennte Innenmembranen an Einschnürungen der mitochondrialen Außenmembran beobachtet. Diese Beobachtungen sind Hinweise für einen koordinierten Ablauf bei der Teilung von mitochondrialer Innen- und Außenmembran.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Num1-vermittelte Verankerung der Mitochondrien untersucht. Num1 ist ein 313 kDa großes, kortikales Protein, welches eine wichtige Rolle bei der Migration des Zellkerns spielt und an der Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex der Mutterzelle beteiligt ist. Elektronentomographische Untersuchungen der mitochondrialen Verankerungsstellen am Zellkortex zeigten Einstülpungen der Plasmamembran, welche direkte Kontakte zur mitochondrialen Außenmembran bildeten. Dementsprechend erfolgt die Befestigung der Mitochondrien in der Mutterzelle vermutlich über Kontakte mit der Plasmamembran. Die hier beschriebenen Einstülpungen der Plasmamembran an den mitochondrialen Verankerungsstellen zeigten eine auffallende Ähnlichkeit zu den Membraneinstülpungen, welche durch große, heterodimere,

unbewegliche Proteinkomplexe an der Plasmamembran, sogenannte Eisosomen, gebildet werden. Ein unmittelbarer Zusammenhang zu den durch Eisosomen gebildeten Membraninvaginationen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Während in *S. cerevisiae* und Säugetieren die mitochondriale Dynamik sehr gut untersucht und detailliert beschrieben wurde, ist über die mitochondriale Fusion in Algen und höheren Pflanzen nur sehr wenig bekannt. Um die Fusion von Mitochondrien in der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nachzuweisen, wurden die Mitochondrien von Gameten unterschiedlichen Paarungstyps mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Die Durchmischung der Fluoreszenzfarbstoffe in den Zygoten zeigte die mitochondriale Fusion. Die Fusion der Mitochondrien konnte in Wildtypzygoten und mit geringerer Effizienz in Zygoten von respiratorischen Mutanten nachgewiesen werden. Daraus wird geschlussfolgert, dass Mitochondrien regelmäßig in *Chlamydomonas reinhardtii* fusionieren.

## Summary

Mitochondria are highly dynamic organelles that constantly fuse and divide in many different cell types. The bakers' yeast *S. cerevisiae* is an ideal model organism to study mitochondrial dynamics.

Several aspects of yeast mitochondrial dynamics have been investigated in this work by using modern light and electron microscopic techniques. A versatile collection of mitochondrial marker plasmids was produced. A mitochondria-targeted version of the photoconvertible fluorescent protein Dendra2 was used to establish an assay that facilitates the tracking of individual mitochondria in yeast. The dynamin-related protein Dnm1 is the key component of the mitochondrial fission in *S. cerevisiae*. So far it is not known whether Dnm1 only mediates mitochondrial outer membrane fission or if it is also responsible for mitochondrial inner membrane fission. Specific proteins that mediate mitochondrial inner membrane fission are yet unknown. A putative participation of Dnm1 in the fission of the mitochondrial inner membrane was addressed in this work. In combination with different variants of Dnm1 the photoconversion of mitochondria-targeted Dendra2 revealed that the mitochondrial matrix is constricted at sites where Dnm1 or Dnm1<sup>G185S</sup> assemble at the mitochondrial surface. Ultrastructural analysis of putative Dnm1 binding sites uncovered opposing cristae structures or separated mitochondrial inner membranes at sites of mitochondrial outer membrane constriction. These results suggest a coordinated process for the fission of the mitochondrial inner and outer membranes.

Another part of this study dealt with the Num1 mediated anchoring of mitochondria to the cell cortex. Num1 is a 313 kDa large cortical protein that is involved in nuclear migration and also functions in mitochondrial anchoring in the mother cell. Electron tomography of the anchoring sites revealed plasma membrane invaginations directly contacting the mitochondrial outer membrane. Thus, attachment of mitochondria in the mother appears to be established by contacts to the plasma membrane. The described invaginations of the plasma membrane showed a remarkable similarity to membrane invaginations formed by large, heterodimeric, immobile protein complexes that are called eisosomes. However, a direct coherence to the membrane invaginations formed by eisosomes could not be proven.

While mitochondrial dynamics have been described in great detail in *S. cerevisiae* and mammals, only little is known about mitochondrial fusion in algae and higher plants. To investigate whether mitochondrial fusion occurs in the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, mitochondria were stained with fluorescent dyes in gametes.

The mixing of fluorescent markers was detected by fluorescence microscopy in zygotes indicating mitochondrial fusion. The fusion of mitochondria was observed in wild type zygotes, and also in respiratory mutants, albeit with less efficiency. This suggests that mitochondria readily fuse in *Chlamydomonas reinhardtii*.



## 1. Einleitung

Mitochondrien sind essentielle, semiautonome Organellen in nahezu allen eukaryotischen Zellen. Die mitochondriale Morphologie ist sehr vielseitig und variabel. Bedingt durch koordiniert ablaufende Fusions- und Teilungsereignisse sowie den mitochondrialen Transport entlang des Zytoskeletts unterliegen Mitochondrien ständigen morphologischen Veränderungen. Dabei variiert die Form und Anzahl von Mitochondrien und deren zelluläre Verteilung je nach Organismus und Zelltyp sowie den metabolischen Bedürfnissen der jeweiligen Zelle (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994; Nunnari *et al.*, 1997; Okamoto und Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007; Benard und Karbowski, 2009; Westermann, 2010a; Friedman und Nunnari, 2014). Außer der Erzeugung von Energie in Form von ATP erfüllen Mitochondrien zahlreiche wichtige Funktionen innerhalb der Zelle, und mitochondriale Fehlfunktionen werden mit einer Reihe von humanen Krankheiten assoziiert (Schapira, 2006; Detmer und Chan, 2007; Westermann, 2010b; Ylikallio und Suomalainen, 2012; Nunnari und Suomalainen, 2012).

### 1.1. Ursprung, Struktur und Funktionen von Mitochondrien

Die Entdeckung von Mitochondrien als zytoplasmatische Organellen eukaryotischer Zellen erfolgte vor über 100 Jahren. Sie lässt sich jedoch nicht auf eine einzelne Person zurückführen, da im Zeitraum von 1850 bis 1890 mehrere zytologische Forscher von granulären Strukturen oder „Fadenkörpern“ berichteten, von denen es sich bei einigen um Mitochondrien gehandelt haben könnte. Als einer der Ersten beobachtete Albert von Kölliker 1857 kornartige Strukturen im Zytoplasma von Muskelzellen (Lehninger, 1964). Im Jahre 1886 entwickelte der Zytologe Richard Altmann eine Fuchsin-Färbetechnik für Mitochondrien, welche er damals selbst noch als „Bioplasten“ bezeichnete (Scheffler, 2008). Der Begriff Mitochondrien bildet sich aus den griechischen Wörtern für Faden (*mitos*) und Korn (*chóndros*) und wurde 1898 durch Carl Benda geprägt, welcher damit das Aussehen von Mitochondrien in Spermatozyten als in Fäden aufgereihe Körner beschrieb (Benda, 1898). Jedoch sollte es weitere 50 Jahre dauern, bis Mitochondrien als Ort des oxidativen Energiemetabolismus identifiziert werden konnten (Kennedy und Lehninger, 1949). Ihren evolutionären Ursprung haben Mitochondrien wissenschaftlichen Studien zufolge in einem  $\alpha$ -Proteobakterium, welches sich vor schätzungsweise zwei Milliarden Jahren zu einem Endosymbionten einer primitiven eukaryotischen Zelle oder eines Archaeobakteriums

entwickelte (Gray *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 2008; Lane und Martin, 2010). Die Entwicklung dieser urzeitlichen  $\alpha$ -Proteobakterien zu den modernen Mitochondrien hatte eine Reihe molekularer Umstrukturierungen zur Folge: ganze Stoffwechselwege verschwanden, ein Großteil der genetischen Information für die Struktur und Funktion von Mitochondrien wurden in den Zellkern übertragen (Adams und Palmer, 2003; Timmis *et al.*, 2004) und zahlreiche Proteinfunktionen, wie z. B. die Proteinimportmaschinerie (Neupert und Hermann, 2007; Chacinska *et al.*, 2009), sind erst durch die co-evolutionäre Entwicklung der Wirtszelle notwendig geworden.

Hinweise für die Richtigkeit der Endosymbiontentheorie finden sich beispielsweise im Aufbau und der Struktur von Mitochondrien. Genau wie ihre bakteriellen Vorfahren verfügen Mitochondrien über zwei voneinander getrennte und funktionell verschiedene Membranen. Die mitochondriale Außenmembran und die Innenmembran der Mitochondrien umschließen den dazwischen liegenden Intermembranraum und grenzen die proteinreiche Matrix im Inneren der Mitochondrien vom Zytosol ab. Die Innenmembran bildet als innere Grenzmembran (IBM, *inner boundary membrane*), welche parallel zur Außenmembran verläuft, und als Cristae-Membran zwei weitere Subkompartimente, die über sogenannte *cristae junctions* (ca. 10-15 nm) miteinander verbunden sind. Als Cristae bezeichnet man die zur Oberflächenvergrößerung dienenden, lamellaren oder tubulären Einstülpungen der Innenmembran in die Mitochondrienmatrix (Palade, 1953; Perkins *et al.*, 1997; Frey und Mannella, 2000; Mannella, 2008). Die Subkompartimente der Innenmembran unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung stark voneinander. Während beispielsweise die Atmungskettenkomplexe und die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase, die gemeinsam mittels oxidativer Phosphorylierung Energie in Form von ATP erzeugen, fast ausschließlich in der Cristae-Membran lokalisiert sind, befinden sich die Proteinimportkomplexe der Innenmembran vorwiegend in der IBM (Vogel *et al.*, 2006; Wurm und Jakobs, 2006; Zick *et al.*, 2009; Wilkens *et al.*, 2012). Die Diffusion dieser Innenmembranproteine zwischen beiden Subkompartimenten wird vermutlich durch einen großen Multiproteinkomplex an den *cristae junctions* verhindert (Harner *et al.*, 2011; Hoppins *et al.*, 2011; von der Malsburg *et al.*, 2011).

Aus evolutionsbiologischer Sicht entspricht die mitochondriale Innenmembran der eigentlichen Zellmembran des urzeitlichen, symbiontischen  $\alpha$ -Proteobakteriums. Untermuert wird dies durch eine für Eubakterien typische Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Innenmembran. So kommt beispielsweise das Phospholipid Cardiolipin ausschließlich in den Membranen von Bakterien und in Mitochondrien (insbesondere in der mitochondrialen Innenmembran) vor (Ren *et al.*, 2014). Verschiedene phylogenetische Analysen sowie

zahlreiche Parallelen zwischen der mitochondrialen ATP-Produktion über die Elektronentransportkette und der Energiegewinnung bei  $\alpha$ -Proteobakterien untermauern zusätzlich die Verwandtschaft von Mitochondrien und  $\alpha$ -Proteobakterien (Yang *et al.*, 1985; Gray *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 2001). Der Ursprung der mitochondrialen Außenmembran ist bisher umstritten, da sie über prokaryotische und eukaryotische Eigenschaften verfügt. Wahrscheinlich handelt es sich jedoch eher um die frühere Außenmembran des  $\alpha$ -Proteobakteriums als um eine phagosomale Membran der Wirtszelle (Cavalier-Smith, 1983).

Ein weiteres Merkmal der Mitochondrien, welches die Endosymbiontentheorie bestätigt, ist das Vorhandensein eines eigenen mitochondrialen Genoms (Nass und Nass, 1963; Lang *et al.*, 1999). Der für die mitochondriale DNA (mtDNA) benötigte Transkriptions- und Translationsapparat fungiert eigenständig und ähnelt dem Proteinsyntheseapparat von Prokaryoten (Gray *et al.*, 1999; Attardi und Schatz, 1988; Lecrenier und Foury, 2000; Kelly und Scarpulla, 2004). Im Verlauf der Evolution wurde fast das gesamte Genom des Endosymbionten eliminiert oder durch Gentransfer in den Zellkern integriert, wodurch sich die Mitochondrien zu semiautonomen Organellen entwickelten (Adams und Palmer, 2003; Timmis *et al.*, 2004). Infolgedessen verfügt beispielsweise *S. cerevisiae* über ca. 200 kerncodierte Proteine, welche für die Genexpression und den Erhalt der mtDNA notwendig sind (Grivell *et al.*, 1999; Sickmann *et al.*, 2003). Da interessanterweise viele der mtDNA-modifizierenden Enzyme, wie zum Beispiel die mtDNA-Polymerase, am nächsten mit Bakteriophagenproteinen verwandt sind (Lecrenier *et al.*, 1997; Tiranti *et al.*, 1997), basiert die komplexe Maschinerie zur Aufrechterhaltung und Expression der mtDNA vermutlich auf einer Infektion des mitochondrialen Vorfahren. Je nach Organismus codiert die mtDNA für eine begrenzte Anzahl mitochondrialer Faktoren wie zum Beispiel rRNAs, tRNAs oder funktionell wichtige Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe und mitochondrialer Ribosomen. Während im mitochondrialen Genom des Menschen 13 (Anderson *et al.*, 1981) proteincodierende Gene vorhanden sind, werden in *Chlamydomonas reinhardtii* (Gray und Boer, 1988; Michaelis *et al.*, 1990) und *S. cerevisiae* (Grivell *et al.*, 1995; Foury *et al.*, 1998; Towpik, 2005) jeweils nur 8 Proteine auf der mtDNA verschlüsselt. Über 99 % der mitochondrial lokalisierten Proteine werden im Zellkern codiert (Sickmann *et al.*, 2003; Gabaldon und Huynen, 2007) und müssen posttranslational über die in den mitochondrialen Membranen lokalisierten, hoch konservierten Transportkomplexe aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien transportiert werden (Attardi und Schatz, 1988; Wiedemann *et al.*, 2004; Neupert und Hermann, 2007; Chacinska *et al.*, 2009). Um die respiratorische Kompetenz als Funktionen von Mitochondrien zu gewährleisten, ist unter

anderem ein koordinierter Ablauf der Expression des Kerngenoms und der mtDNA notwendig.

Zusätzlich zur Energieerzeugung in Form von ATP (Saraste, 1999) sind Mitochondrien an zahlreichen metabolischen Prozessen beteiligt. Mitochondrien erfüllen wichtige Funktionen im Citratzyklus, im Harnstoffzyklus, bei der Synthese einiger Aminosäuren, der Häm-Biosynthese und der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren (Scheffler, 2001). Eine außerordentlich wichtige Rolle spielen Mitochondrien bei der Synthese von Eisen/Schwefel-Clustern. Die Biogenese und Assemblierung von Eisen/Schwefel-Clustern beginnt in den Mitochondrien, welche dadurch auch für fakultativ anaerobe Organismen essentiell sind. Die Eisen/Schwefel-Cluster bilden essentielle Kofaktoren von Proteinen, die im Elektronentransport, in der enzymatischen Katalyse oder an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Kispal *et al.*, 2005; Lill und Mühlenhoff, 2006). Homologien in der Biogenese von Eisen/Schwefel-Clustern bei Mitochondrien und Bakterien bestätigen erneut den bakteriellen Ursprung von Mitochondrien (Strain *et al.*, 1998; Kispal *et al.*, 1999; Lill und Mühlenhoff, 2006).

Die vielfältigen Funktionen von Mitochondrien werden durch die strukturelle Aufteilung des Organells in verschiedene Reaktionsräume mit unterschiedlicher Proteinkomposition gewährleistet. Diese charakteristische Morphologie und die zelltypische Verteilung der Mitochondrien innerhalb einer Zelle sind für die Aufrechterhaltung mitochondrial gesteuerter Prozesse sehr wichtig. Fehlfunktionen der Mitochondrien können verschiedenste Krankheiten des Menschen verursachen. Dazu gehören Diabetes (Yoon *et al.*, 2011; Leem und Koh, 2012), Grüner Star (Lascaratos *et al.*, 2012) und eine Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B.: Alzheimer, Parkinson und Chorea Huntington (Schapira, 2006; Schapira, 2008; Schon und Przedborski, 2011; Nunnari und Suomalainen, 2012; Itoh *et al.*, 2013). Des Weiteren sind Mitochondrien an der Regulation von Entwicklungsprozessen (Chan, 2006; van Blerkom, 2009), an zellulären Alterungsprozessen (Balaban *et al.*, 2005) und der Apoptose (Green und Reed, 1998; Desagher und Martinou, 2000; Perfettini *et al.*, 2005; Youle und Karbowski, 2005) beteiligt. Einer aktuellen Studie zur Folge wird auch die Migration und Invasion von Brustkrebszellen durch die mitochondriale Dynamik reguliert (Zhao *et al.*, 2013). Insgesamt sind bisher 184 mitochondrial lokalisierte Proteine bekannt, welche mit humanen Krankheiten assoziiert sind (Schwimmer *et al.*, 2006; Chinault *et al.*, 2009). Aus diesen Gründen ist die Entschlüsselung der komplexen Zusammenhänge zwischen mitochondrial assoziierten Proteinen und der Morphologie von Mitochondrien von großer Relevanz.

## 1.2. Mitochondriale Dynamik in *Saccharomyces cerevisiae*

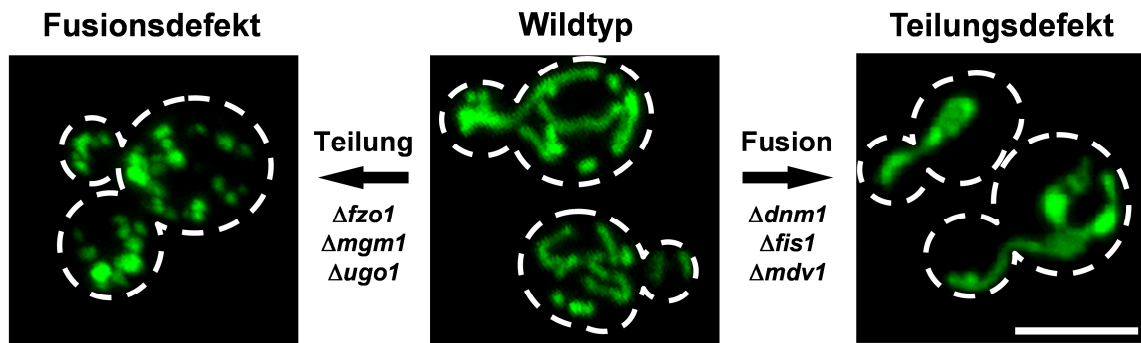
Viele wichtige Erkenntnisse über die Verbindung zwischen der mitochondrialen Morphologie und der Funktionalität von Mitochondrien wurden mit Hilfe des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Sherman, 2002; Altmann *et al.*, 2007) gewonnen. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist ein fakultativ anaerober, einzelliger Pilz, der sich leicht kultivieren lässt und dessen ca. 12 Mbp großes Genom vollständig sequenziert ist (Goffeau *et al.*, 1996). Aufgrund der großen Homologien zwischen *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten können die erhaltenen Resultate häufig auf komplexere, vielzellige Organismen übertragen werden. Zwischen *S. cerevisiae* und dem Menschen besteht eine Homologie von 46 % (Lander *et al.*, 2001; Foury und Kucej, 2002) und ca. 17 % des Hefegenoms können orthologen Genfamilien zugeordnet werden, die mit humanen Krankheiten assoziiert sind (Heinicke *et al.*, 2007).

Ein großer Vorteil von Hefe gegenüber höheren Eukaryoten ist die leichtere genetische Manipulierbarkeit. Plasmide lassen sich einfach durch Hitzeschock transformieren (Gietz und Schiestl, 2007) und zur Untersuchung rezessiver Mutationen können Veränderungen auf chromosomaler Ebene, wie z. B. Gendelektionen oder Fusionen mit Reportergenen, durch homologe Rekombination in haploiden Hefestämmen vorgenommen werden (Sherman, 2002). Von *S. cerevisiae* existieren Kollektionen von Deletionsstämmen, in denen nahezu jeder offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*) des Genoms deletiert ist (Winzeler *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002; Kastenmayer *et al.*, 2006). Die Ergebnisse von genomweiten Analysen zur Genexpression und Proteinlokalisierung (Ghaemmaghami *et al.*, 2003; Huh *et al.*, 2003) sind gemeinsam mit zahlreichen anderen wissenschaftlichen Ergebnissen in einer öffentlichen Datenbank (<http://yeastgenome.org>) gespeichert.

Als fakultativ anaerober Organismus ist *S. cerevisiae* in der Lage, den eigenen Energiebedarf ausschließlich durch Fermentation zu decken (Tzagoloff und Dieckmann, 1990). Beim Wachstum auf einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle, wie beispielsweise Glukose oder Fruktose, werden respiratorische Funktionen durch Katabolitenrepression unterdrückt (Gancedo, 1998), wodurch die oxidative Phosphorylierung und die mtDNA nicht weiter notwendig sind. Stehen keine fermentierbaren Kohlenstoffquellen zum Wachstum zur Verfügung, werden Gene induziert, die für die Atmung benötigt werden und es der Zelle ermöglichen, ATP aus nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Glyzerin, Ethanol, Laktat) herzustellen (Johnston, 1999; Piskur *et al.*, 2006). Die mitochondriale Morphologie wird maßgeblich von der Art der verfügbaren Kohlenstoffquelle bestimmt. Während Hefen beim Wachstum auf einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle ein mäßig verzweigtes

mitochondriales Netzwerk ausbilden, verfügen Hefezellen, die auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen, über mehr Mitochondrienmasse und stark verzweigte Mitochondrien (Visser *et al.*, 1995; Egner *et al.*, 2002), welche mehr Cristae ausbilden. Ein weiterer Faktor, welcher die mitochondriale Morphologie prägt, ist die jeweilige Wachstumsphase der Zelle. Während des Wachstums, der Paarung und der Sporulation verändert sich die mitochondriale Morphologie regelmäßig. Für die Anpassung der mitochondrialen Morphologie an die physiologischen Bedingungen und für die Vererbung von Mitochondrien sind die mitochondriale Fusion und Teilung sowie der gerichtete Transport entlang des Zytoskeletts essentiell (Nunnari *et al.*, 1997; Gorsich und Shaw, 2004; Okamoto und Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007; Friedman und Nunnari, 2014).

Die Fusion und Teilung von Mitochondrien sind koordiniert ablaufende, antagonistische Prozesse. In logarithmisch wachsenden Hefezellen besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der mitochondrialen Fusion und Teilung (Sesaki und Jensen, 1999; Shaw und Nunnari, 2002; Westermann, 2008) mit bis zu 2,5 Fusions- und Teilungsereignissen pro Zelle und Minute (Nunnari *et al.*, 1997; Jakobs *et al.*, 2003a). Die Mitochondrien logarithmisch wachsender, wildtypischer Zellen bilden ein subkortikales Netzwerk verzweigter Tubuli, deren Durchmesser ca. 300-400 nm beträgt (Hoffmann und Avers, 1973; Egner *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2012). Wird das Gleichgewicht zwischen mitochondrialer Fusion und Teilung durch Deletion einer der Fusions- oder Teilungskomponenten entsprechend in eine Richtung verschoben, bewirkt dies eine dramatische Veränderung der mitochondrialen Morphologie (Abb. 1-1). Zum Beispiel verursacht die Deletion des für *Fzo1* (*fuzzy onions homolog*) codierenden Gens, dass die mitochondriale Fusion blockiert wird. Die fortschreitende Teilung führt zur Bildung fragmentierter Mitochondrien und verursacht respiratorische Inkompetenz durch den Verlust der mtDNA (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Wird hingegen die mitochondriale Teilung beispielsweise durch Verlust von *Dnm1* (*dynamin-related*) blockiert, entsteht aufgrund der weiterhin stattfindenden Fusion ein großes, zusammenhängendes Mitochondrium mit netzartigen Verzweigungen (Otsuga *et al.*, 1998). Bei der gleichzeitigen und gleich starken Störung beider Prozesse bildet sich wieder ein wildtypisches Netzwerk aus (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999).



**Abb. 1-1: Mitochondriale Morphologie bei Defekten in der Fusions- und Teilungsmaschinerie.** Abgebildet ist die mitochondriale Morphologie logarithmisch gewachsener Zellen, deren mitochondriale Matrix durch GFP (mtGFP, Westermann und Neupert, 2000) markiert ist. In wildtypischen Zellen (Mitte) entsteht durch das Gleichgewicht aus mitochondrialer Fusion und Teilung ein verzweigtes Netzwerk tubulärer Mitochondrien. Durch Fehlen einer der mitochondrialen Fusionskomponenten ( $\Delta fzo1$ ,  $\Delta mgm1$ ,  $\Delta ugo1$ ) kommt es bei fortschreitender mitochondrialer Teilung zu Störungen der Fusion und damit zur Ausbildung fragmentierter Mitochondrien (links am Beispiel von  $\Delta fzo1$ ). Umgekehrt führen Störungen der mitochondrialen Teilung, beispielsweise durch Verlust einer der Teilungskomponenten ( $\Delta dnm1$ ,  $\Delta fis1$ ,  $\Delta mdv1$ ), bei fortschreitender Fusion zur Bildung eines einzelnen, zusammenhängenden Mitochondriums mit netzartigen Verzweigungen (rechts am Beispiel von  $\Delta dnm1$ ). Die Fluoreszenzaufnahmen sind Projektionen der maximalen Intensität von grünen (mtGFP) z-Stapeln bestehend aus 20 Ebenen. Die Konturen der Zellen sind durch Strichlinien dargestellt. Der Maßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Generell ist die mitochondriale Dynamik von erheblicher physiologischer Bedeutung (Youle und van der Bliek, 2012). Die mitochondriale Fusion sorgt beispielsweise für die Vermischung von Mitochondrien und bewirkt damit die Komplementation der unterschiedlichen mitochondrialen Genome in heteroplasmatischen Zellen (Zellen mit wildtypischen und mutierten Varianten von mtDNA) sowie die Kompensation verschiedener somatischer Schäden auf Proteinebene (Sato *et al.*, 2006). Die Teilung von Mitochondrien ist zum Beispiel für deren Vererbung und Abbau wichtig. Da Mitochondrien nicht *de novo* entstehen, sondern sich durch Wachstum bestehender Organellen bilden, müssen sie während der Zytokinese geteilt und an die Tochterzelle weitervererbt werden (Warren und Wickner, 1996, Westermann, 2014). Darüber hinaus spielt die mitochondriale Teilung eine entscheidende Rolle bei der Apoptose (Fannjiang *et al.*, 2004; Jagasia *et al.*, 2005; Youle und Karbowski, 2005; Hoppins und Nunnari, 2012). Gemeinsam sind die mitochondriale Fusion und Teilung für die Vermischung der OXPHOS-Komplexe (OXPHOS, oxidative Phosphorylierung) in den Cristae verantwortlich, wodurch eine statische Situation mit fixen Verteilungen innerhalb der Mitochondrien einer Zelle verhindert wird (Muster *et al.*, 2010; Wilkens *et al.*, 2012).

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Aspekte der mitochondrialen Dynamik in *S. cerevisiae* erörtert. Einige hierfür wichtige Proteine sind in Tabelle 1-1 zusammengefasst.

**Tab. 1-1: Übersicht der für diese Arbeit relevanten Proteine von *S. cerevisiae*.**

Protein	Bedeutung des Proteinnamens	Funktion	Referenz
Abf2	<i>ARS-binding factor</i>	Verpackung der mitochondrialen DNA	Diffley und Stillman, 1991
Atp3	<i>ATP synthase</i>	$\gamma$ -Untereinheit im $F_1F_0$ -ATP-Synthase	Paul <i>et al.</i> , 1994
Caf4	<i>CCR4 associated factor</i>	mitochondriale Teilung	Griffin <i>et al.</i> , 2005
Dnm1	<i>dynamamin-related</i>	mitochondriale Teilung	Otsuga <i>et al.</i> , 1998
Fis1	<i>mitochondrial fission</i>	mitochondriale Teilung	Mozdy <i>et al.</i> , 2000
Fzo1	<i>fuzzy onions homolog</i>	mitochondriale Fusion	Rapaport <i>et al.</i> , 1998
Lsp1	<i>long chain bases stimulate phosphorylation</i>	Hauptkomponente der Eisosomen	Zhang <i>et al.</i> , 2004
Mdm10	<i>mitochondrial distribution and morphology</i>	Bestandteil des ERMES-Komplexes, Verteilung der mtDNA	Sogo und Yaffe, 1994
Mdm12	<i>mitochondrial distribution and morphology</i>	Bestandteil des ERMES-Komplexes, Verteilung der mtDNA	Berger <i>et al.</i> , 1997
Mdm31	<i>mitochondrial distribution and morphology</i>	Erhalt der mtDNA	Dimmer <i>et al.</i> , 2005
Mdm32	<i>mitochondrial distribution and morphology</i>	Erhalt der mtDNA	Dimmer <i>et al.</i> , 2005
Mdm34	<i>mitochondrial distribution and morphology</i>	Bestandteil des ERMES-Komplexes, Verteilung der mtDNA	Youngman <i>et al.</i> , 2004
Mdm36	<i>mitochondrial distribution and morphology</i>	mitochondriale Verankerung in der Mutterzelle	Hammermeister <i>et al.</i> , 2010
Mdv1	<i>mitochondrial division</i>	mitochondriale Teilung	Tieu und Nunnari, 2000
Mip1	<i>mitochondrial DNA polymerase</i>	Replikation der mtDNA	Foury, 1989
Mgm1	<i>mitochondrial genome maintenance</i>	mitochondriale Fusion, Erhalt der mtDNA	Wong <i>et al.</i> , 2000
Mmm1	<i>maintenance of mitochondrial morphology</i>	Bestandteil des ERMES-Komplexes, Verteilung der mtDNA	Burgess <i>et al.</i> , 1994
Mmr1	<i>mitochondrial Myo2 receptor-related</i>	mitochondriale Verankerung in der Knospe, Rekrutierung von Myo2 an Mitochondrien	Itoh <i>et al.</i> , 2004; Chernyakov <i>et al.</i> , 2013
Myo2	<i>myosin</i>	mitochondrialer Transport	Itoh <i>et al.</i> , 2002
Num1	<i>nuclear migration</i>	Assemblierung der mitotischen Spindel, mitochondriale Verankerung in der Mutterzelle	Kormanec <i>et al.</i> , 1991
Pil1	<i>phosphorylation inhibited by long chain bases</i>	Hauptkomponente der Eisosomen	Zhang <i>et al.</i> , 2004
Qcr2	<i>ubiquinol-cytochrome C oxidoreductase</i>	Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette	Dorsman und Grivell, 1990
Ugo1	ugo = japanisch für Fusion	mitochondriale Fusion	Sesaki und Jensen, 2001
Yme2	<i>yeast mitochondrial DNA escape</i>	Erhalt von Struktur und Anzahl mitochondrialer Nukleotide	Park <i>et al.</i> , 2006



### 1.2.1. Transport und Vererbung von Mitochondrien

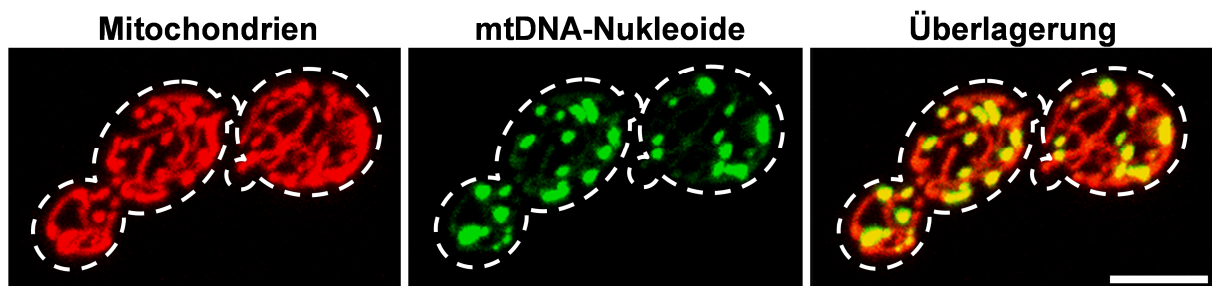
Mitochondrien können, genau wie viele andere Zellorganellen, nicht *de novo* entstehen und müssen während der Zellteilung an die Tochterzellen weitervererbt werden (Warren und Wickner, 1996). Zur Untersuchung zellulärer Mechanismen bei der Verteilung und Vererbung von Zellorganellen hat sich *S. cerevisiae* als ein guter Modellorganismus bewährt (Catlett und Weisman, 2000; Pruyne *et al.*, 2004; Fagarasanu und Rachubinski, 2007). Der gerichtete Transport von Mitochondrien ist für deren Vererbung entscheidend und erfolgt in *S. cerevisiae* ausschließlich entlang des Aktinzytoskeletts (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994; Hermann und Shaw, 1998; Fehrenbacher *et al.*, 2004) durch das Myosinmotorprotein Myo2 (Altmann *et al.*, 2008; Förtsch *et al.*, 2011) in die Knospe. Die Menge der in der Knospe befindlichen Mitochondrien ist stark reguliert und korreliert mit zunehmender Knospengröße (Rafelski *et al.*, 2012). Durch das mitochondriale Außenmembranprotein Mmr1 werden die Mitochondrien am kortikalen Endoplasmatischen Retikulum (ER) in der Knospe verankert und somit vom Rücktransport in die Mutterzelle abgehalten (Swayne *et al.*, 2011). Mmr1 ist spezifisch an den Mitochondrien in der Knospe lokalisiert (Itoh *et al.*, 2004) und assembliert in punktförmigen Strukturen, welche die Mitochondrien mit dem kortikalen ER verbinden (Swayne *et al.*, 2011). Da in den Knospen von *Δmmr1*-Zellen eine geringere Menge von Mitochondrien vorkommt, ist Mmr1 vermutlich für die korrekte Vererbung von Mitochondrien notwendig (Swayne *et al.*, 2011). Einer neueren Studie zufolge wird der Myo2-abhängige Transport der Mitochondrien in die Knospe ebenfalls durch Mmr1 vermittelt (Chernyakov *et al.*, 2013). Anhand dieser Daten sind zwei Modelle zur Funktion von Mmr1 bei der Vererbung von Mitochondrien denkbar. Einerseits könnte Mmr1 als Myo2-Rezeptor beim Transport der Mitochondrien in die Knospe dienen, andererseits könnte es sich bei Mmr1 um einen Retentionsfaktor der Mitochondrien in der Knospe handeln.

Während der Vererbung von Mitochondrien muss bei der Zellteilung gleichzeitig die Retention einiger Mitochondrien in der Mutterzelle sichergestellt werden (Yang *et al.*, 1999). Die dafür notwendigen Mechanismen und die daran beteiligten molekularen Komponenten waren zu Beginn dieser Arbeit unbekannt. Eine mögliche Komponente für die mitochondriale Verankerung am Zellkortex ist das ca. 313 kDa große Protein Num1 (Kormanec *et al.*, 1991; Cervený *et al.*, 2007). Num1 ist ein kortikales Protein, welches mit Dynein und den Mikrotubuli interagiert und für die Migration des Zellkerns von der Mutterzelle in die Knospe verantwortlich ist (Kormanec *et al.*, 1991; Farkasovsky und Küntzel, 2001).

Interessanterweise ist Num1 auch an der mitochondrialen Teilung beteiligt und für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie sowie für die richtige Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Zelle notwendig (Dimmer *et al.*, 2002; Cervený *et al.*, 2007). Num1 ist über eine C-terminale PH-Domäne (PH, Pleckstrin-Homologie) am Zellkortex verankert und interagiert mit Mdm36 und der mitochondrialen Teilungskomponente Dnm1 (Cervený *et al.*, 2007; Hammermeister *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2013). In Zellen, denen Num1 fehlt, zeigen Mitochondrien einen starken Defekt in der mitochondrialen Teilung, welcher dem Phänotyp von  $\Delta dnm1$ -Zellen sehr ähnelt (Cervený *et al.*, 2007). Da in  $\Delta dnm1 \Delta num1$ -Doppelmutanten die Mutterzellen häufig keine Mitochondrien besitzen, spielen Num1 und Dnm1 eine wichtige Rolle beim Erhalt und der Verteilung von Mitochondrien (Cervený *et al.*, 2007).

Gemeinsam mit der Vererbung der Mitochondrien wird auch die Weitergabe der mitochondrialen DNA gewährleistet (Westermann, 2014). In *S. cerevisiae* wird die mitochondriale DNA, welche hauptsächlich in linearer aber auch in zirkulärer Form vorliegt, vermutlich nach dem „rolling circle“-Mechanismus amplifiziert (Maleszka *et al.*, 1991; Williamson, 2002). Die mtDNA ist gemeinsam mit einigen Proteinen, wie zum Beispiel der mtDNA-Polymerase Mip1 (Foury, 1989) oder dem DNA-bindenden Verpackungsprotein Abf2 (Diffley und Stillman, 1991; Diffley und Stillman, 1992), in sogenannten Nukleoiden organisiert. Eine Hefezelle besitzt ca. 10-40 Nukleoide, welche an der mitochondrialen Innenmembran verankert sind (Meeusen und Nunnari, 2003; Dimmer *et al.*, 2005), sich gleichmäßig über das mitochondriale Netzwerk verteilen (Abb. 1-2) und jeweils ein bis zwei Kopien der mtDNA enthalten (Williamson und Fennell 1979; Chen und Butow, 2005; Kucej und Butow, 2007). Für die zielgerichtete Vererbung der mitochondrialen DNA wurde ein großer Komplex postuliert, der unter anderem aus demERMES-Komplex (ER-mitochondria encounter structure) besteht und beide mitochondrialen Membranen durchspannt, um die mtDNA-Nukleoide an das ER zu knüpfen und die Replikation oder Verteilung der mtDNA zu kontrollieren (Kornmann und Walter, 2010; Murley *et al.*, 2013). DerERMES-Komplex besteht aus den Proteinen Mmm1, Mdm10, Mdm12 sowie Mdm34 und bildet eine Verbindung zwischen ER und Mitochondrien (Kornmann *et al.*, 2009). Diese Kontakte ermöglichen den Lipidaustausch zwischen den beiden Organellen (Achleitner *et al.*, 1999; Kornmann *et al.*, 2009). Zusätzlich sorgt derERMES-Komplex für eine Kopplung der Nukleoide an eine extra-mitochondriale mtDNA-Segregationsmaschinerie (Hobbs *et al.*, 2001; Boldogh *et al.*, 2003; Meeusen und Nunnari, 2003). Die beiden Innenmembranproteine Mdm31 und Mdm32 zeigen eine genetische Interaktion mit den Komponenten desERMES-

Komplexes und sind für den Erhalt der mitochondrialen DNA notwendig (Dimmer *et al.*, 2005). Die genauen Mechanismen zur gezielten Vererbung funktioneller Mitochondrien und intakter mtDNA sind bisher nicht vollständig verstanden. Offenbar sind die Zellen jedoch in der Lage, zwischen unterschiedlich aktiven Mitochondrien innerhalb des kontinuierlichen Netzwerks zu differenzieren und bevorzugt intakte Mitochondrien mit einem höheren Redoxpotential an die nachfolgende Generation weiterzugeben (Jakobs *et al.*, 2003b; McFaline-Figueroa *et al.*, 2011).



**Abb. 1-2: Mitochondrien und mtDNA-Nukleoide in *S. cerevisiae*.** Dargestellt ist die Verteilung der Mitochondrien und der mitochondrialen DNA-Nukleoide in wildtypischen Hefezellen, welche Abf2-GFP (Dimmer *et al.*, 2005) und in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes ERFP (Scholz *et al.*, 2013) besitzen, in Minimalmedium mit fermentierbarer Kohlenstoffquelle zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und mittels konfokaler 3D-Mikroskopie analysiert worden. Die Abbildung zeigt zwei Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus mit Knospen verschiedener Größe. Die Fluoreszenzbilder sind Projektionen der maximalen Intensität von roten (Mitochondrien), grünen (mtDNA-Nukleoide) und überlagerten z-Stapeln bestehend aus 20 Ebenen. Die Umrisse der Zellen sind durch Strichlinien angedeutet. Der Größenmaßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$ . Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden und wurden auch für eine Abbildung in Westermann (2014) verwendet.

### 1.2.2. Die mitochondriale Fusion

Die mitochondriale Fusion ist für den Erhalt funktioneller Mitochondrien notwendig und hilft dabei, zellulären Stress zu verringern, indem partiell geschädigte Mitochondrien durch gegenseitige Vermischung komplementiert werden (Nakada *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2001). In *Saccharomyces cerevisiae* ist die mitochondriale Fusion ebenfalls für die Vererbung der mtDNA notwendig (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Durch das Vorhandensein der mitochondrialen Außen- und Innenmembran müssen bei der Fusion von Mitochondrien zwei koordiniert ablaufende Membranfusionsereignisse stattfinden. Dies erfolgt durch individuelle Maschinerien, welche sich jeweils in der Außen- bzw. Innenmembran befinden und funktionell aufeinander abgestimmt sind (Hoppins *et al.*, 2007).

Die mitochondriale Fusionsmaschinerie von *S. cerevisiae* besteht aus den beiden hoch konservierten GTPasen Fzo1 und Mgm1 sowie dem hefespezifischen Protein Ugo1 (Westermann, 2008). Fzo1 aus *S. cerevisiae* ist das homologe Protein zu Fzo aus *Drosophila*

*melanogaster*. Fzo, welches erstmals in einer Studie über sterile männliche *Drosophila*-Mutanten als Mediator für die mitochondriale Fusion beschrieben wurde, ist eine große GTPase der mitochondrialen Außenmembran, die eine entscheidende Rolle bei der Fusion von Mitochondrien während der Differenzierung von Spermatiden in *Drosophila* spielt (Hales und Fuller, 1997). Die Entdeckung von Fzo führte zur Identifizierung einer Reihe homologer Proteine in zahlreichen anderen Organismen. Funktionelle Analysen von Proteinen dieser als Mitofusine bezeichneten Proteinfamilie brachten Schlüsselrollen bei der Fusion der mitochondrialen Außenmembran in Hefen (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998), Würmern (Breckenridge *et al.*, 2008; Rolland *et al.*, 2009), Fliegen (Deng *et al.*, 2008) und Säugern (Santel und Fuller, 2001; Legros *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003) zum Vorschein.

Fzo1 ist über zwei Transmembrandomänen in der mitochondrialen Außenmembran verankert und exponiert eine GTPase-Domäne sowie mehrere Coiled-Coil-Domänen ins Zytosol. Die Loop-Region zwischen den zwei Transmembrandomänen ragt hingegen in den Intermembranraum und dient möglicherweise zur Interaktion mit Komponenten der mitochondrialen Innenmembran (Fritz *et al.*, 2001). Die große Dynamin-verwandte GTPase Mgm1 ist für die Fusion der mitochondrialen Innenmembran in Hefe notwendig (Wong *et al.*, 2000; Meeusen *et al.*, 2006). Entdeckt wurde Mgm1 in einem Screen nach Mutanten mit einem Defekt im Erhalt der mitochondrialen DNA (Jones und Fangman, 1992). Mgm1 ist hoch konserviert und homologe Proteine, wie zum Beispiel EAT-3 und OPA1, erfüllen ähnliche Funktionen bei der Fusion der mitochondrialen Innenmembran in Würmern (Breckenridge *et al.*, 2008; Kanazawa *et al.*, 2008; Rolland *et al.*, 2009), Fliegen (McQuibban *et al.*, 2006) und Säugern (Olichon *et al.*, 2003; Cipolat *et al.*, 2004). Mgm1 besitzt einen hydrophoben Transmembrananker, eine GTPase-Domäne, eine mittlere Domäne unbekannter Funktion und eine GTPase-Effektordomäne (Wong *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2003; Okamoto und Shaw, 2005). In der Zelle kommt Mgm1 in einer langen (l-Mgm1) und einer kurzen (s-Mgm1) Isoform vor. Letztere entsteht durch die Proteolyse der Transmembrandomäne von l-Mgm1. Während die lange Isoform über die Transmembrandomäne in der mitochondrialen Innenmembran verankert wird, ist s-Mgm1 im Intermembranraum peripher an die Innenmembran assoziiert (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). Die dritte Fusionskomponente in *S. cerevisiae* ist Ugo1, welches in der mitochondrialen Außenmembran verankert ist (Sesaki und Jensen, 2001). Ugo1 ist ein polytopisches Protein, dessen C-Terminus in den Intermembranraum ragt. Es besitzt drei Transmembrandomänen und zwei vermeintliche Carrier-Domänen (Coonrod *et al.*, 2007). Vermutlich dient Ugo1 als

Adapter zwischen Fzo1 und Mgm1 und vermittelt dabei die Interaktion der beiden Proteine bei der mitochondrialen Fusion (Sesaki und Jensen, 2004; Hoppins *et al.*, 2009).

Die mitochondriale Fusion erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten (Okamoto und Shaw, 2005). Nach der initialen Bildung von *trans*-Komplexen durch Oberflächenproteine der fusionierenden Außenmembranen erfolgt die Durchmischung der Lipiddoppelschichten. In beiden Schritten übernimmt Fzo1 eine Schlüsselfunktion (Westermann, 2008). Fzo1 besitzt eine ähnliche Domänenstruktur wie virale Fusionsproteine oder SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) und könnte dementsprechend die benachbarten Membranen durch Aneinanderlagerung von Coiled-Coil-Domänen in unmittelbaren Kontakt bringen und für die Lipiddurchmischung sorgen (Weber *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 2006; Westermann, 2008). Um die Energiebarriere für die Vermischung der Lipiddoppelschicht zu überwinden, wäre die von der GTPase-Domäne bereitgestellte Energie ausreichend (Okamoto und Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Im Anschluss an die Fusion der mitochondrialen Außenmembranen kann die Fusion der mitochondrialen Innenmembranen erfolgen. Hierbei vermittelt Mgm1, analog zu Fzo1, die Verknüpfung und Fusion der gegenüberliegenden Innenmembranen durch die Bildung von *trans*-Komplexen (Meeusen *et al.*, 2006; Westermann, 2008). Die genauen Mechanismen der mitochondrialen Fusion sind bisher unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Fusion der Außenmembran getrennt von der Fusion der Innenmembran stattfinden kann (Meeusen *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). Die Fusion der Innenmembran muss nicht zwangsläufig auf die Fusion der Außenmembran folgen, wenn letztere unmittelbar nach ihrer Fusion durch die mitochondriale Teilungsmaschinerie wieder geteilt wird (Liu *et al.*, 2009).

### 1.2.3. Die mitochondriale Teilung

Die mitochondriale Teilung ermöglicht die Bildung neuer Mitochondrien und trägt zu deren Qualitätskontrolle bei, indem sie den Abbau von geschädigten Mitochondrien ermöglicht. Zudem ist die mitochondriale Teilung maßgeblich an der Apoptose beteiligt (Youle und Karbowski, 2005) und in höheren Eukaryoten entscheidend für Entwicklungsprozesse, wie zum Beispiel die Embryonalentwicklung in *C. elegans* (Labrousse *et al.*, 1999) oder die Synapsenbildung neuronaler Zellen (Li *et al.*, 2004).

Die Teilungsmaschinerie von *S. cerevisiae* umfasst nach aktuellem Stand der Forschung das Außenmembranprotein Fis1 und die drei zytosolischen Proteine Dnm1, Mdv1

und Caf4 (Westermann, 2008). Der zentrale Akteur der mitochondrialen Teilung ist Dnm1, ein hoch konserviertes, Dynamin-verwandtes Protein, welches zu einer Familie großer GTPasen gehört, die sich selbst assemblieren, um Membranstrukturen zu regulieren (Otsuga *et al.*, 1998; Lackner und Nunnari, 2009). Homologe Proteine von Dnm1 spielen in Würmern (Labrousse *et al.*, 1999), Säugern (Smirnova *et al.*, 2001) und höheren Pflanzen (Arimura und Tsutsumi, 2002; Jin *et al.*, 2003; Arimura *et al.*, 2004a) ebenfalls eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Teilung. Dnm1 besitzt eine N-terminale GTPase-Domäne, eine mittlere Domäne, eine als Insert B bezeichnete, hydrophile Region sowie eine C-terminale GTPase-Effektordomäne (Okamoto und Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Der als Insert B bezeichnete Bereich vermittelt die Interaktion mit dem Adapterprotein Mdv1 und ist für die Membranrekrutierung notwendig (Bui *et al.*, 2012). Die Mittel- und GTPase-Effektordomäne von Dnm1 sind für intra- und intermolekulare Wechselwirkungen wichtig und ermöglichen Dnm1 die Selbstassemblierung zu größeren Multimeren (Fukushima *et al.*, 2001; Bhar *et al.*, 2006). Diese Dnm1-Multimere bilden *in vivo* punktförmig aussehende Strukturen (Otsuga *et al.*, 1998; Mozdy *et al.*, 2000), welche hoch dynamisch sind und sich durch fortwährende Assemblierung und Disassemblierung an der mitochondrialen Oberfläche auszeichnen (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Untersuchungen zur Lokalisation von Dnm1 zeigten, dass Dnm1 häufig an Einschnürungen der Mitochondrien oder an den Enden mitochondrialer Tubuli vorkommt (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999). Durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie von GFP-markiertem Dnm1 konnte das Vorhandensein von Dnm1-Komplexen an Stellen mitochondrialer Teilungsereignisse bestätigt werden (Legesse-Miller *et al.*, 2003; Naylor *et al.*, 2006). Von den an der mitochondrialen Teilung beteiligten Proteinen ist Dnm1 aktuellen Modellen zur Folge für die eigentliche Teilung der Mitochondrienmembran verantwortlich (Okamoto und Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007; Westermann *et al.*, 2008).

Das mitochondriale Außenmembranprotein Fis1 dient dabei vermutlich als Membranrezeptor für die mitochondriale Teilungsmaschinerie. Fis1 ist gleichmäßig über die mitochondriale Oberfläche verteilt und mittels C-terminaler Transmembrandomäne in der mitochondrialen Außenmembran verankert (Mozdy *et al.*, 2000). Am N-Terminus besitzt Fis1 eine TPR-Domäne (TPR, *tetratricopeptide repeat*), welche in das Zytosol exponiert ist und zur Interaktion mit Dnm1 über die Adapterproteine Mdv1/Caf4 dient (Zhang und Chan, 2007). Mdv1 und Caf4 sind paraloge Proteine mit gleicher Domänenstruktur und redundanten Funktionen bei der mitochondrialen Teilung (Tieu und Nunnari, 2000; Griffin *et al.*, 2005). Im N-terminalen Bereich besitzen beide Proteine zwei  $\alpha$ -Helices, welche zur Interaktion mit

Fis1 dienen. Auf eine mittlere Coiled-Coil-Domäne, welche vermutlich homotypische Proteininteraktionen vermittelt, folgt bei beiden Proteinen eine C-terminale WD40-Domäne, die einen siebenblättrigen Propeller ausbildet. Über diese WD40-Domäne interagiert Mdv1/Caf4 mit Dnm1 (Tieu *et al.*, 2002; Zhang und Chen, 2007). Homologe Proteine von Mdv1 oder Caf4 in höheren Eukaryoten sind bisher nicht bekannt.

In der initialen Phase der mitochondrialen Teilung helfen Fis1 und Mdv1/Caf4 bei der Rekrutierung von Dnm1 an die Stellen für die mitochondriale Teilung und unterstützen zudem die dynamische Assemblierung von Dnm1 an der mitochondrialen Oberfläche (Tieu *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2005; Naylor *et al.*, 2006; Zhang und Chen, 2007; Lackner *et al.*, 2009). Dnm1 assembliert *in vitro* selbstständig und bildet im nukleotidfreien oder GDP-gebundenen Zustand lange, gebogene Filamente (Ingelman *et al.*, 2005; Mears *et al.*, 2011). Im GTP-gebundenen Zustand bildet Dnm1 ringförmige Spiralen, deren Durchmesser (*in vitro* ca. 129 nm) ungefähr mit dem Durchmesser mitochondrialer Teilungsereignisse (*in vivo*  $109 \pm 24$  nm) übereinstimmt (Ingelman *et al.*, 2005; Mears *et al.*, 2011). Dementsprechend könnte Dnm1 sich an den Mitochondrien anlagern, diese spiralförmig umschließen und die mitochondriale Teilung mittels der mechanochemischen Kraft aus der GTP-Hydrolyse vermitteln (Ingelman *et al.*, 2005). Die aus Dnm1 gebildeten Spiralen sind jedoch wesentlich kleiner als der eigentliche Durchmesser von Mitochondrien (ca. 300-400 nm). Anhand zeitaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie wurde herausgefunden, dass bei der mitochondrialen Teilung parallel zur Assemblierung von Dnm1 eine Einschnürung des mitochondrialen Tubulus erfolgt (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Die Einschnürung der Mitochondrien ist eine Grundvoraussetzung für deren Teilung und erfolgt offensichtlich unabhängig von Dnm1 und Fis1, da derartige Verengungen ebenfalls in  $\Delta dnm1$ - und  $\Delta fis1$ -Zellen zu beobachten sind (Jakobs *et al.*, 2003a; Legesse-Miller *et al.*, 2003; Ingelman *et al.*, 2005; Mears *et al.*, 2011). Möglicherweise werden die mitochondrialen Einschnürungen durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) verursacht. Kontakte zwischen Mitochondrien und dem ER sind häufig und bestehen auch unter dynamischen Bedingungen (Perktold *et al.*, 2007; Kornmann *et al.*, 2009; Friedman *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2012). Mit Hilfe von 3D-Rekonstruktionen elektronentomographischer Daten konnten enge Kontakte zwischen Mitochondrien und dem ER hochauflösend visualisiert werden. In Bereichen, in welchen die mitochondrialen Tubuli Einschnürungen aufwiesen, umgab das ER die Mitochondrien fast vollständig (Friedman *et al.*, 2011). Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Rolle des Endoplasmatischen Retikulums bei der mitochondrialen Teilung zeigten, dass die überwiegende Mehrheit (87 %) der mitochondrialen Teilungsereignisse in räumlicher Nähe zu Kontaktstellen von Mitochondrien

und ER lagen (Friedman *et al.*, 2011). Aufgrund der ER-vermittelten Bildung der mitochondrialen Einschnürungen ist das Endoplasmatische Retikulum entscheidend an der Initiation der mitochondrialen Teilung beteiligt (Friedman *et al.*, 2011). Jedoch sind der zuständige Mechanismus und die notwendigen Kriterien, nach denen die Stelle der mitochondrialen Teilung festgelegt wird, bisher vollkommen unverstanden. Nur ein Bruchteil der Dnm1-Assemblierungen an Mitochondrien führt auch tatsächlich zu einer Spiralisierung und zur schlussendlichen Teilung (Legesse-Miller *et al.*, 2003).

Während die Teilung der mitochondrialen Außenmembran und die daran beteiligten Komponenten sehr gut untersucht sind, ist der Ablauf der Innenmembranteilung und die dafür notwendige Maschinerie unbekannt. Einerseits könnte, analog zur mitochondrialen Fusion, eine eigenständige Maschinerie für die Teilung der Innenmembran existieren, andererseits wäre auch eine Beteiligung von Dnm1 an der Innenmembranteilung vorstellbar. Ein mögliches Szenario wäre beispielsweise, dass die Teilung der mitochondrialen Außenmembran durch die bekannte Teilungsmaschinerie erst erfolgt, nachdem die Innenmembran gegenüberliegender Cristae im Bereich der mitochondrialen Einschnürungen fusioniert wurde. Um die Teilung der mitochondrialen Innenmembran besser zu verstehen, bedarf es weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen. Als sicher gilt jedoch, dass die Regulation der mitochondrialen Teilung für die normale Zellfunktion entscheidend ist. Die übermäßige mitochondriale Teilung steht in Verbindung mit Diabetes und zahlreichen neurodegenerativen Krankheiten (Cho *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2011; Itoh *et al.*, 2013). Darüber hinaus verursachte eine dominant negative Mutation im humanen DRP1 den Tod der Patientin kurze Zeit nach der Geburt (Waterham *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2010) und in Mäusen ist die Deletion von Drp1 embryonal letal (Ishihara *et al.*, 2009; Wakabayashi *et al.*, 2009).



### 1.3. Mitochondrien in *Chlamydomonas reinhardtii*

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein wichtiger Modellorganismus der Botanik, Zell- und Molekularbiologie. Da *Chlamydomonas* als fakultativ heterotropher Organismus hauptsächlich Photosynthese betreibt, aber auch zum Wachstum auf Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle befähigt ist, kann die Grünalge relativ unkompliziert im Labor kultiviert werden. *Chlamydomonas* eignet sich ideal zur Untersuchung der Physiologie, des Reproduktionszyklus und der zellulären Architektur von Grünalgen (Harris, 2001).

Die Morphologie von Mitochondrien in *Chlamydomonas* wurde bereits in den 1970er Jahren elektronenmikroskopisch untersucht und anhand von Serienschnitten rekonstruiert. Während des vegetativen Zellzyklus sind sowohl kleine, vereinzelte Mitochondrien, aber auch große verzweigte mitochondriale Netzwerke vorhanden (Osafune *et al.*, 1972). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Mitochondrien in Gameten ein großes, stark verzweigtes Retikulum bilden (Grobe und Arnold, 1975). In Zygoten zerfallen die Mitochondrien in kleine, unverzweigte Organellen, ohne dass ein Anzeichen für mitochondriale Fusion gefunden werden konnten (Grobe und Arnold, 1977). Durch Verwendung mitochondrienspezifischer Fluoreszenzfarbstoffe konnte die Existenz der zuvor elektronenmikroskopisch beschriebenen mitochondrialen Netzwerke in *Chlamydomonas* bestätigt werden (Morris *et al.*, 1985). Die Kombination von licht- und elektronenmikroskopischen Methoden enthüllte die Veränderung der mitochondrialen Morphologie im Verlauf des circadianen Licht-Dunkel-Zyklus vegetativer Zellen (Ehara *et al.*, 1995). Einer aktuellen Studie zufolge vollziehen Mitochondrien in Zygoten eine Reihe sehr dynamischer, morphologischer Veränderungen. Nachdem die Zygoten für eine Woche bei Dunkelheit inkubiert wurden, fragmentierten die Mitochondrien in kleinere Einheiten. Sobald die Zellen dem Licht ausgesetzt wurden, werden die Mitochondrien während der Reifung der Zygoten schrittweise in tubuläre und verzweigte Strukturen umgewandelt. Diese akkumulieren um den Zellkern, bevor sie sich in der gesamten Zelle ausbreiten und an die Tochterzellen weitervererbt werden (Aoyama *et al.*, 2009). Die vorhandenen Indizien deuten insgesamt darauf hin, dass Mitochondrien in Grünalgen ebenso dynamisch wie in Hefe und Tieren sein könnten.

Die mitochondriale Fusion wurde in einer Vielzahl von Organismen des Pilz- und Tierreiches beschrieben (Westermann, 2010a). Unumstritten ist die wichtige Rolle der mitochondrialen Fusion bei der Vererbung mitochondrialer DNA in Hefe (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998), bei der Aufrechterhaltung der Atmungskapazität von

Säugerzellen (Chen *et al.*, 2005) sowie in zellulären Entwicklungsprozessen, wie beispielsweise die Spermatogenese in Fliegen (Hales und Fuller, 1997) oder die Embryogenese von Mäusen (Chen *et al.*, 2003). Darüber hinaus wirkt die mitochondriale Fusion durch Komplementation mitochondrialer Genprodukte der Zellalterung entgegen (Nakada *et al.*, 2001, Ono *et al.*, 2001). Wesentlich weniger ist über die mitochondriale Fusion im Pflanzenreich bekannt (Logan, 2010; Westermann, 2010b). Homologe Proteine zu bekannten Fusionsproteinen anderer Organismen, wie zum Beispiel Hefen, Würmern oder Säugern, wurden bisher nicht beschrieben. In Zellen höherer Pflanzen konnte jedoch die Fusion von Mitochondrien beobachtet werden. Durch Verwendung des schaltbaren Fluoreszenzproteins Kaede in der mitochondrialen Matrix von Zwiebelepidermiszellen konnte nach Photokonversion von Kaede die mitochondriale Fusion durch die Vermischung von grünen und roten Mitochondrien nachgewiesen werden (Arimura *et al.*, 2004b). Auch die Fusion von kultivierten Tabakmesophyllprotoplasten, deren Mitochondrien entweder rote oder grüne Fluoreszenzmarker enthielten, resultierte in massiver Mitochondrienfusion (Sheahan *et al.*, 2005). Die Proteine und molekularen Mechanismen, welche die Fusion von Mitochondrien in Pflanzenzellen verantworten, sind nicht bekannt. Auch von direkten Beweisen für die mitochondriale Fusion in *Chlamydomonas* wurde bisher nicht berichtet und selbst nach der Sequenzierung des Genoms von *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant *et al.*, 2007) bleiben Orthologe von Fzo1/Mitofusine oder Mgm1/EAT-3/OPA1 Proteinen unbekannt.

## 1.4. Zielsetzung

Mitochondrien sind bedingt durch koordiniert ablaufende Fusions- und Teilungsereignisse sowie den mitochondrialen Transport entlang des Zytoskeletts sehr dynamische Organellen, welche ständigen morphologischen Veränderungen unterliegen. Obwohl die Prozesse der mitochondrialen Dynamik in den letzten Jahrzehnten intensiv in *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten untersucht wurden, sind die zugrundeliegenden Mechanismen der mitochondrialen Dynamik und die daran beteiligten Proteine nur teilweise entschlüsselt.

In dieser Arbeit sollten bisher unbekannte Aspekte der mitochondrialen Dynamik, wie z. B. eine mögliche Beteiligung von Dnm1 bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran oder die Stellen der Verankerung von Mitochondrien am Zellkortex, durch moderne licht- und elektronenmikroskopische Methoden untersucht werden. Hierfür sollte zunächst die bereits vorhandene Auswahl mitochondrialer Markerplasmide für *S. cerevisiae* insbesondere in Hinsicht auf die Verwendung von photokonvertierbaren Fluoreszenzproteinen erweitert werden. Anschließend sollte auf Grundlage des photokonvertierbaren Fluoreszenzproteins Dendra2 ein Assay etabliert werden, mit dessen Hilfe die Dynamik individueller Mitochondrien oder bestimmter mitochondrialer Komponenten spezifisch innerhalb einer Zelle verfolgt werden kann. Durch Verwendung des Photokonversionsassays sollte ebenfalls untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Teilung der mitochondrialen Innenmembran und der Assemblierung von Dnm1 an der mitochondrialen Außenmembran besteht. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen sollten Erkenntnisse über die Ultrastruktur der Mitochondrien an den Dnm1-Assemblierungspunkten gewonnen werden. Um herauszufinden, auf welche Weise die Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex erfolgt, sollten die mitochondrialen Verankerungsstellen in der Mutterzelle mittels Elektronentomographie untersucht werden.

Im Vergleich zu *S. cerevisiae* und Säugetieren ist in Algen und höheren Pflanzen nur wenig über die mitochondriale Dynamik, insbesondere die Fusion von Mitochondrien, bekannt. Um die Fusion von Mitochondrien in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nachzuweisen, sollte ein Versuchsansatz verwendet werden, der auf der Vermischung verschiedenfarbiger Fluoreszenzmarker in Zygoten basiert und bereits erfolgreich in Hefe dazu diente, die mitochondriale Fusion aufzudecken (Nunnari *et al.*, 1997).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Organismen und Kultivierungsbedingungen

#### 2.1.1. Hefestämme

Für das Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae* wurde nach Standardprozeduren verfahren (Sherman, 2002, Gietz und Schiestl, 2007). Die verwendeten Hefedeletionsmutanten stammen, sofern nicht anders angegeben, aus der *MAT $\alpha$* -Deletionsbibliothek (Giaever *et al.*, 2002). Alle verwendeten Hefestämme waren isogen zu YPH500 (Sikorski und Hieter, 1989) oder BY4741 bzw. BY4742 (Brachmann *et al.*, 1998). Die für diese Arbeit verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.

**Tab. 2-1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme.**

Stamm	Genotyp	Referenz
YPH500 (WT)	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52</i>	Sikorski und Hieter, 1989
YDS006	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 [pYX232-<i>mtDendra2</i>]</i>	Scholz <i>et al.</i> , 2013
YDS008	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 [pYX122-<i>mtmCherry</i>]</i>	diese Arbeit
YDS009	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 [pYX113-<i>mtmCherry</i>]</i>	diese Arbeit
YDS010	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 [pYX223-<i>mtmCherry</i>]</i>	diese Arbeit
YDS011	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 [pYX232-<i>mtmCherry</i>]</i>	diese Arbeit
YDS012	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 [pYX142-<i>mtmCherry</i>]</i>	diese Arbeit
BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	diese Arbeit
ATP3-3x <i>Dendra2</i>	<i>ATP3-3xDendra2-HIS3MX6</i>	
YPH500 $\Delta$ <i>dnm1</i> (YKSD017)	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 <i>dnm1<math>\Delta</math>::HIS3</i></i>	Kai Stefan Dimmer, LMU München
YDS019	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 <i>dnm1<math>\Delta</math>::HIS3</i> [pYX232-<i>mtDendra2</i>]</i>	diese Arbeit
YDS033	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 [pYX232-<i>mtDendra2</i>] [pRS415<i>Met25-yEmRFP-DNM1</i>]</i>	diese Arbeit
YDS035	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 <i>dnm1<math>\Delta</math>::HIS3</i> [pYX232-<i>mtDendra2</i>] [pRS415<i>Met25-yEmRFP-DNM1</i>]</i>	diese Arbeit
YDS047	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 [pYX232-<i>mtDendra2</i>] [pRS415<i>Met25-yEmRFP-DNM1</i><sup>G312D</sup>]</i>	diese Arbeit
YDS049	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 <i>dnm1<math>\Delta</math>::HIS3</i> [pYX232-<i>mtDendra2</i>] [pRS415<i>Met25-yEmRFP-DNM1</i><sup>G312D</sup>]</i>	diese Arbeit
YDS052	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101<sup>ochre</sup> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-<math>\Delta</math>1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52 [pYX232-<i>mtDendra2</i>] [pRS415<i>Met25-yEmRFP-dnm1</i><sup>G185S</sup>]</i>	diese Arbeit

YDS054	<i>MATα ade2-101<sup>ochre</sup> his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801<sup>amber</sup> trp1-Δ63 ura3-52 dnm1Δ::HIS3 [pYX232-mtDendra2] [pRS415Met25-yEmRFP-dnm1<sup>G185S</sup>]</i>	diese Arbeit
BY4742 (WT)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
BY4742 Δ <i>num1</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 num1Δ::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
YMI149	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 [pRS426-MYO2-FIS1]</i>	Kleckner <i>et al.</i> , 2013
BY4742 Δ <i>pil1</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 pil1Δ::kanMX4</i>	Giaever <i>et al.</i> , 2002
YDS062	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 [pYX142-QCR2-Dendra2]</i>	diese Arbeit
YDS063	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 num1Δ::kanMX4 [pYX142-QCR2-Dendra2]</i>	diese Arbeit
YDS066	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 [pYX113-ABF2-Dendra2]</i>	diese Arbeit
YDS083	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 [pVT100U-mtRFP]</i>	diese Arbeit
YDS084	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 num1Δ::kanMX4 [pVT100U-mtRFP]</i>	diese Arbeit
YDS087	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 [pVT100U-mtRFP] [pAG415GPD-Num1-EGFP]</i>	diese Arbeit
YDS088	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 num1Δ::kanMX4 [pVT100U-mtRFP] [pAG415GPD-NUM1-EGFP]</i>	diese Arbeit
YDS093	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 pil1Δ::kanMX4 [pVT100U-mtRFP]</i>	diese Arbeit
YDS094	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 pil1Δ::kanMX4 [pVT100U-mtRFP] [pAG415GPD-NUM1-EGFP]</i>	diese Arbeit
BY4741 <i>PIL1-GFP</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PIL1-GFP-HIS3MX6</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
YDS096	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PIL1-GFP-HIS3MX6 [pAG415GPD-NUM1-DsRed]</i>	diese Arbeit
YDS097	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PIL1-GFP-HIS3MX6 [pAG415GPD-PIL1-DsRed]</i>	diese Arbeit

### 2.1.2. Algenstämme

Die *Chlamydomonas reinhardtii* Wildtypstämme CC-124 *mt<sup>-</sup>* und CC-125 *mt<sup>+</sup>* (Pröschold *et al.*, 2005) und die Mutantenstämme CC-2255 *dum-1 mt<sup>-</sup>* (Matagne *et al.*, 1989), CC-2654 *dum-1 mt<sup>-</sup>* (Randolph-Anderson *et al.*, 1993), CC-3400 *dum-19 mt<sup>-</sup>* (Colin *et al.*, 1995) und CC-4098 *dum-11 mt<sup>-</sup>* (Dorthu *et al.*, 1992; Colin *et al.*, 1995) wurden von der Stammsammlung des *Chlamydomonas* Resource Center, Universität Minnesota, MN, USA bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei einer Temperatur von 19 °C und einem Zyklus mit 12 h Licht und 12 h Dunkelheit in flüssigem M1-Minimalmedium (Sager und Granick, 1953). Die Gametogenese vegetativer Zellen wurde ausgelöst, indem fünf bis sechs Tage alte Kulturen durch zehnminütige Zentrifugation bei 80 x g geerntet, in M1-Minimalmedium ohne Stickstoffquelle (Sager und Granick, 1953) überführt und anschließend für 15 h bei kontinuierlicher Beleuchtung inkubiert wurden. Zygoten von *Chlamydomonas* wurden durch Mischen von Gameten entgegengesetzten Paarungstyps im Verhältnis 1:1 und eine anschließende Inkubation von bis zu 2,5 h bei Licht erzeugt.

## 2.2. Plasmide, Primer und Klonierungsstrategien

Die Klonierung von Plasmiden und deren Amplifikation wurden nach Standardmethoden (Green und Sambrook, 2012) durchgeführt. PCRs erfolgten mit *Pfu*- oder Phusion-DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Anleitung des Herstellers. Zur Markierung von Mitochondrien in *S. cerevisiae* wurden Plasmide verwendet, durch welche Fluoreszenzproteine mit einer mitochondrialen Zielsequenz exprimiert werden konnten. Im Verlauf dieser Arbeit wurden viele neue Plasmide für die Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien und anderen zellulären Strukturen konstruiert (siehe Abschnitt 3-1). In Tabelle 2-2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zusammengefasst.

**Tab. 2-2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.**

Plasmid	Marker	Promotor	Referenz
pYX122-mtmCherry	<i>HIS3</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>TPI</i>	diese Arbeit
pYX113-mtmCherry	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pYX142-mtmCherry	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>TPI</i>	diese Arbeit
pYX223-mtmCherry	<i>HIS3</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pYX232-mtmCherry	<i>TRP1</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>TPI</i>	diese Arbeit
pYX122-mtDendra2	<i>HIS3</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>TPI</i>	diese Arbeit
pYX113-mtDendra2	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pYX142-mtDendra2	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>TPI</i>	diese Arbeit
pYX223-mtDendra2	<i>HIS3</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pYX232-mtDendra2	<i>TRP1</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>TPI</i>	Scholz <i>et al.</i> , 2013
pYX113-Abf2-Dendra2	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pAG415GAL-ccdB-Dendra2	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pAG425GAL-ccdB-Dendra2	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pAG415GPD-ccdB-Dendra2	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GPD</i>	diese Arbeit
pAG425GPD-ccdB-Dendra2	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GPD</i>	diese Arbeit
pAG426GAL-ccdB-Dendra2	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pAG416GPD-ccdB-Dendra2	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GPD</i>	diese Arbeit
pAG415GAL-ccdB-mEos2	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pAG425GAL-ccdB-mEos2	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pAG415GPD-ccdB-mEos2	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GPD</i>	diese Arbeit
pAG425GPD-ccdB-mEos2	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GPD</i>	diese Arbeit
pAG416GAL-ccdB-mEos2	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pAG426GAL-ccdB-mEos2	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GAL</i>	diese Arbeit
pAG416GPD-ccdB-mEos2	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GPD</i>	diese Arbeit
pAG416GPD-ccdB-E2-Crimson	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<i>GPD</i>	diese Arbeit
pYM28-Dendra2	<i>HIS3MX6</i> , Amp <sup>R</sup>		diese Arbeit
pYM28-3xDendra2	<i>HIS3MX6</i> , Amp <sup>R</sup>		diese Arbeit
pRS415Met25-yEmRFP-Dnm1	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>MET25</i>	diese Arbeit
pRS415Met25-yEmRFP-Dnm1 <sup>G312D</sup>	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>MET25</i>	diese Arbeit
pRS415Met25-yEmRFP-Dnm1 <sup>G185S</sup>	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>MET25</i>	diese Arbeit
pRS426-Myo2Fis1	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>MYO2</i>	Förtsch <i>et al.</i> , 2011
pVT100U-mtRFP	<i>URA3</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>ADH</i>	Mark Dürr, AG Westermann, Universität Bayreuth
pAG415GPD-Num1-EGFP	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>GPD</i>	diese Arbeit
pAG415GPD-Num1-DsRed	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>GPD</i>	diese Arbeit
pAG415GPD-Pil1-DsRed	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>GPD</i>	diese Arbeit
pYX142-Qcr2-Dendra2	<i>LEU2</i> , Amp <sup>R</sup>	<i>TPI</i>	Till Klecker, AG Westermann, Universität Bayreuth

Für die Klonierung der mitochondrialen pYX-Reporterplasmide wurden die von Westermann und Neupert (2000) publizierten pYX-Plasmide verwendet und das *GFP*-Gen dieser Plasmide gegen die codierende Sequenz von mCherry bzw. Dendra2 ausgetauscht. Das Plasmid pRSET-B mCherry (Shaner *et al.*, 2004) wurde als Vorlage verwendet, um das *mCherry*-Gen mittels der Oligonukleotide 5'-GCG CGC GGA TCC ATG GTG AGC AAG-3' und 5'-CGC GCG AAG CTT CGA ATT CTT ACT-3' zu amplifizieren. Durch den enzymatischen Verdau mit *Bam*HI und *Hind*III wurde das amplifizierte Fragment zwischen die entsprechenden Schnittstellen in die pYX-Vektoren (Westermann und Neupert, 2000) kloniert und somit eine Reihe von mitochondrialen Reporterplasmiden mit einem rot fluoreszierenden Markerprotein konstruiert (Abb. 3-1). Für die Klonierung des Plasmids pYX232-mtDendra2 (Abb. 3-2; Abb. 3-3; Scholz *et al.*, 2013) wurde die für Dendra2 codierende Sequenz durch enzymatischen Verdau mit *Bam*HI und *Hind*III aus pDendra2-B (Plasmid FP823, Evrogen, Moskau; Russland; Gurskaya *et al.*, 2006) herausgeschnitten. Das entstandene Fragment diente anschließend dazu, die für GFP codierende Sequenz in pYX232-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) zu ersetzen. Diese Klonierungsstrategie wurde ebenfalls angewandt, um das *GFP*-Gen in den anderen mitochondrialen pYX-Reporterplasmiden (Westermann und Neupert, 2000) bzw. im Plasmid pYX113-Abf2-GFP (Dimmer *et al.*, 2005) gegen die codierende Sequenz von Dendra2 auszutauschen.

Zur Erweiterung der Sammlung von Gateway-Plasmiden (Alberti *et al.*, 2007) wurde eine Reihe von Vektoren konstruiert, mit deren Hilfe Fusionsproteine mit Dendra2 (Gurskaya *et al.*, 2006), mEos2 (McKinney *et al.*, 2009) oder E2-Crimson (Strack *et al.*, 2009) am C-terminalen Ende exprimiert werden können (Tab. 3-1). Hierzu gehören unter anderen die Plasmide pAG415GPD-ccdB-Dendra2, pAG425GAL-ccdB-mEos2 und pAG416GPD-ccdB-E2-Crimson (Abb. 3-4). Die Klonierungen dieser Plasmide folgten der gleichen Strategie. Zu Beginn war es jedoch erforderlich die interne *Hind*III-Schnittstelle im *mEos2*-Gen des Ausgangsvektors pmEos2-N1 (McKinney *et al.*, 2009) durch zielgerichtete Mutagenese zu entfernen. Dies erfolgte unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-GGG TAT TCG TGG GAA CGA AGT TTG ACT TTC GAA GAC GGG-3' und 5'-CCC GTC TTC GAA AGT CAA ACT TCG TTC CCA CGA ATA CCC-3' durch Einbringen einer stillen Mutation an Stelle der internen *Hind*III-Schnittstelle. Die resultierende Sequenz von *mEos2* wurde mittels der Oligonukleotide 5'-GCG CGC GCA AGC TTA ATG AGT GCG ATT AAG-3' und 5'-GCG CGC CTC GAG TTA TCG TCT GGC ATT GTC-3' anschließend so amplifiziert, dass vor bzw. nach der codierenden Sequenz eine *Hind*III- bzw. *Xho*I-Schnittstelle eingefügt wurde. Durch den enzymatischen Verdau des PCR-Produkts mit *Hind*III und *Xho*I konnte das modifizierte *mEos2* zwischen die

entsprechenden Schnittstellen in pAG425GAL-ccdB-EGFP (Alberti *et al.*, 2007) kloniert und somit die *EGFP*-Sequenz ersetzen werden. Die Amplifikation der codierenden Sequenzen von Dendra2 und E2-Crimson erfolgte auf Grundlage der Plasmide pDendra2-B (Evrogen) bzw. YIPlac204TKC-E2-Crimson-HDEL (Plasmid #38771, Addgene, Cambridge, MA, USA; Strack *et al.*, 2009). Auch *Dendra2* und *E2-Crimson* wurden mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-ATA TAT ATA AGC TTA ATG AAC ACC CCG GGA-3' und 5'-ATA TAT CTC GAG TCA CTT GTA CAC GCC GCT-3' bzw. 5'-GCA GTA CGA AGC TTA ATG GAT AGC ACT GAG AAC GTC-3' und 5'-GA TAG TGT CTC GAG CTA CTG GAA CAG GTG GTG G-3' so amplifiziert, dass sie von einer *HindIII*- und *XhoI*-Schnittstelle flankiert wurden. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden ebenfalls mit *HindIII*- und *XhoI* verdaut und an Stelle des *GFP*-Gens in pAG415GPD-ccdB-EGFP (Alberti *et al.*, 2007) bzw. pAG416GPD-ccdB-EGFP (Alberti *et al.*, 2007) kloniert.

Um pYM28-Dendra2 (Abb. 3-5 A) herzustellen, wurde die codierende Sequenz von Dendra2 mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-GCA CTG GTC GAC GGA GCA GGT GCT GGT GCT GGT GCT GGA GCA ATG AAC ACC CCG GGA ATT A-3' und 5'-CGT AGG GGA TCC TCA CTT GTA CAC GCC GCT GTC G-3' von pDendra2-B (Evrogen) amplifiziert und nach enzymatischen Verdau mit *SalI* und *BamHI* in den Zielvektor pYM28 (Janke *et al.*, 2004) kloniert. Auf diese Weise konnte die GFP-codierende Sequenz in pYM28 gegen die DNA-Sequenz von Dendra2 ausgetauscht werden. Das Plasmid pYM28-3xDendra2 (Abb. 3-5 A) wurde aus den Plasmiden pYM28 (Janke *et al.*, 2004) und pUC19-3xDendra2 (hergestellt von Martina Mazurová, AG Westermann, Universität Bayreuth) konstruiert. Hierfür wurde der Vektor pUC19-3xDendra2 mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *BglII* verdaut und das ca. 2,3 kb große Fragment, welches für ein Fusionsprotein aus drei aufeinanderfolgenden Dendra2-Molekülen (3xDendra2) codiert, für die Klonierung in den Zielvektor pYM28 verwendet. Durch den enzymatischen Verdau von pYM28 mit *SalI* und *BamHI* konnte die codierende Sequenz von GFP entfernt und gegen das mit *SalI* und *BglII* verdaute 3xDendra2-Fragment ausgetauscht werden. Die Ligation der durch *BamHI* und *BglII* verursachten Überhänge führte zum Verlust der Schnittstelle am 3'-Ende des 3xDendra2-Fragments (Abb. 3-5 A). Um die Funktionalität dieses Konstruktes zu testen, wurde pYM28-3xDendra2 nach dem von Janke *et al.* (2004) beschriebenen Protokoll als Grundlage für die genomische Markierung von *ATP3* verwendet. Mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-C ATT ACT AAT GAA CTG GTT GAT ATT ATT ACT GGT GCT TCC TCT TTG GGA CGT ACG CTG CAG GTC GAC-3' (ATP3-S3-Primer) und 5'-CC TTT TCT ATT TAA GGT ATT CTT TGG ATA TAT ACT TCG TCT CAT CAA GTC TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G-3' (ATP3-S2-Primer) konnte mittels PCR ein ca. 4 kb großes Fragment von pYM28-3xDendra2 amplifiziert werden. Dieses Fragment besteht aus der



codierenden Sequenz von 3xDendra2 und einer *HIS3MX6*-Kassette, welche bereits im Ursprungsvektor pYM28 (Janke *et al.*, 2004) vorhanden war und als Selektionsmarker diente. Das amplifizierte Fragment wurde mittels Transformation in den wildtypischen Hefestamm BY4742 (Brachmann *et al.*, 1998) eingebracht und durch homologe Rekombination an dem 3'-Ende von *ATP3* integriert (Abb. 3-5 B). Auf diese Weise wurde der Stamm BY4742 *ATP3-3xDendra2* (Tab. 2-1; Abb. 3-5 C) hergestellt.

Das Plasmid pRS415Met25-GFP-Dnm1 (Prof. Janet M. Shaw, Universität Utah, Salt Lake City, UT, USA) diente zur Herstellung der *DNM1*-Varianten *DNM1*<sup>G312D</sup> und *dnm1*<sup>G185S</sup>, welche durch zielgerichtete Mutagenese von *DNM1* unter Verwendung des QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, La Jolla, CA, USA) erzeugt wurden (hergestellt von Sandra Merz-Jakob, AG Westermann, Universität Bayreuth). Für die Konstruktion des Plasmids pAG415Met25-yEmRFP-Dnm1 (Abb. 3-6; Abb. 3-7) musste zunächst die interne *XbaI*-Schnittstelle in *DNM1* entfernt werden. Dies erfolgte durch zielgerichtete Mutagenese (Mutagenese Kit, Stratagene) mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-GGG ACT AAT GCT TTA GAT ATC TTG TCT GG-3' und 5'-CCA GAC AAG ATA TCT AAA GCA TTA GTC CC-3' und resultierte in einer stillen Mutation. Anschließend wurde die codierende Sequenz von yEmRFP (Keppler-Ross *et al.*, 2008) mit Hilfe der Oligonukleotide 5'-GCG CGC TCT AGA ATG GTT TCA AAA GGT-3' und 5'-GCG CGC GGG CCC TTT ATA TAA TTC ATC C-3' amplifiziert und über den enzymatischen Verdau mit *XbaI* und *ApaI* zwischen die entsprechenden Schnittstellen von pAG415Met25-GFP-Dnm1 inseriert. Auf diese Weise konnte das *GFP*-Gen durch die codierende Sequenz von yEmRFP ersetzt werden. Die Klonierung von pAG415Met25-yEmRFP-Dnm1<sup>G312D</sup> und pAG415Met25-yEmRFP-Dnm1<sup>G185S</sup> erfolgte nach der selben Vorgehensweise.

Die Plasmide pAG415GPD-Num1-EGFP, pAG415GPD-Num1-DsRed und pAG415GPD-Pil1-DsRed wurden mit Hilfe des Gateway® Systems (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) konstruiert. Hierzu diente genomische WT-DNA, welche mittels MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, USA) präpariert wurde, als Template für die Amplifikation von *NUM1* und *PIL1*. Die Amplifikation von *NUM1* erfolgte mit den Oligonukleotiden 5'-GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AAA AAA ATG TCC CAC AAC AAC AGG C-3' und 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCG TAA ATT GCC AAA TGA TCG GC-3'. Für die Amplifikation von *PIL1* wurden die Oligonukleotide 5'-GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AAA AAA ATG CAC AGA ACT TAC TCT TTA AGA AAT-3' und 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC AGC TGT TGT TTG TTG GGG A-3' verwendet. Danach wurden die

amplifizierten PCR-Produkte mittels Gateway-Technologie in die Vektoren pAG415GPD-ccdB-EGFP (Alberti *et al.*, 2007) oder pAG415GPD-ccdB-DsRed (Alberti *et al.*, 2007) kloniert.

## 2.3. Fluoreszenzmikroskopie

### 2.3.1. Generelle Bedingungen, Mikroskope und Zubehör

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurden die zu untersuchenden Zellen mit 0,5 % Low Melting Point Agarose zwischen Objektträger und Deckglas immobilisiert. Die Epifluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Axioplan 2 Mikroskop (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland), welches mit einem Plan-Neofluar 100x/1,30 Ph3 Ölobjektiv (Carl Zeiss Lichtmikroskopie) ausgestattet war. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer Evolution VF Mono Cooled Monochrom-Kamera (Intas, Göttingen, Deutschland) erstellt und mit Image Pro Plus 5.0 und Scope Pro 4.5 Software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) verarbeitet. Für die konfokale Mikroskopie wurde ein TCS SP5 System (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in Kombination mit einem inversen Leica DMI 6000 CS Trino Mikroskop verwendet, welches mit einem HCX PL APO CS 63,0x/1,40 OIL UV Ölobjektiv und einem 63,0x/1,30 GLYC UV Glyzerinobjektiv ausgestattet war. Dieses System ist mit LAS AF SP5 MicroLab Software versehen und verfügt über einen UV-Diodenlaser (405 nm/5 mW), einen Argon-Laser (458 nm/5 mW, 476 nm/5 mW, 488 nm/20 mW, 496 nm/5 mW, 514 nm/20 mW) und einen DPSS-Laser (561 nm/20 mW) sowie die entsprechenden akustooptisch regelbaren Filter (AOTF, *acustooptic tuneable filters*).

### 2.3.2. Photokonversion des Fluoreszenzproteins Dendra2

Die Photokonversion von Dendra2 erfolgte am konfokalen Leica TCS SP5 im LiveDataMode. Vor Beginn des eigentlichen Assays wurde durch Verwendung von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie mit einer geringen Anregungsintensität kontrolliert, dass ausschließlich grüne und keine roten Fluoreszenzsignale von Dendra2 vorhanden sind. Anschließend wurde ein passender Bereich mit Zellen ausgewählt und ein z-Stapel bestehend aus DIC (differentieller Interferenzkontrast), grüner Fluoreszenz (Anregung: 488 nm, Emission: 500-550 nm) und roter Fluoreszenz (Anregung: 561 nm, Emission: 575-700 nm)

aufgenommen. Die Aufnahme von DIC- und Fluoreszenzbildern erfolgte zeitgleich und im bidirektionalem Scanmodus. In einem zweiten Schritt erfolgte die Photokonversion von Dendra2 durch UV-Bestrahlung (405 nm) in einer zuvor ausgewählten Region von Interesse (ROI, *region of interest*). Unmittelbar im Anschluss an die Photokonversion wurden weitere z-Stapel zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die folgenden Einstellungen für die Photokonversion von Dendra2 verwendet: UV-Diodenlaser eingeschaltet, Argon-Laser (20 % Leistung), DPSS-Laser eingeschaltet, AOTF (405) 10 %, AOTF (488) 4 %, AOTF (561) 20 %.

### 2.3.3. MitoTracker-Färbung von Mitochondrien in *C. reinhardtii*

Zur Färbung der Mitochondrien vegetativer Zellen wurden vier bis sechs Tage alte Kulturen ungefähr 1-3 h nach Beginn der Beleuchtungsperiode durch zehnmünütige Zentrifugation bei 80 x g geerntet und in 1 ml M1-Medium resuspendiert. Gameten wurden ebenfalls für 10 min bei 80 x g zentrifugiert und anschließend in 1 ml stickstofffreiem M1-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden entweder mit 0,5 µM MitoTracker Green FM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) oder 1,0 µM MitoTracker Orange CMTMRos gefärbt und für 30 min bzw. 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mindestens zweimal durch Zentrifugation für 3 min bei 80 x g in Medium gewaschen.

### 2.3.4. FRAP-Experimente in *Chlamydomonas reinhardtii*

Die FRAP-Experimente (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*) zur Untersuchung der möglichen Diffusion von MitoTracker-Farbstoffen zwischen verschiedenen Mitochondrien in *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgten am konfokalen Leica TCS SP5 mit dem LiveDataMode. Hierfür wurden Gameten der wildtypischen Stämme CC-124 *mt<sup>-</sup>* und CC-125 *mt<sup>+</sup>* wie zuvor beschrieben kultiviert und mit MitoTracker Green oder MitoTracker Orange gefärbt. Vor dem gezielten Ausbleichen des grünen bzw. orangen MitoTracker-Farbstoffes wurde ein z-Stapel bestehend aus DIC und grüner Fluoreszenz (Anregung: 488 nm, Emission 500-550 nm) bzw. DIC und roter Fluoreszenz (Anregung: 561 nm, Emission: 575-650 nm) aufgenommen. Die Aufnahme der DIC- und Fluoreszenzbilder erfolgte zeitgleich und im bidirektionalem Scanmodus. Im Anschluss erfolgte das Ausbleichen des jeweiligen MitoTracker-Farbstoffes in einem definierten Bereich durch intensive Bestrahlung mit dem Licht des Lasers, der auch zur Anregung des grünen

bzw. orangen MitoTracker-Farbstoffes verwendet wurde. Unmittelbar nach dem Ausbleichen wurden weitere z-Stapel in Zeitintervallen von zwei Minuten aufgenommen. Folgende Einstellungen wurden für die FRAP-Experimente verwendet: Argon-Laser (20 % Leistung), AOTF (488) 10 % bzw. 100 % innerhalb der ROI zum Ausbleichen von MitoTracker Green; DPSS-Laser eingeschaltet, AOTF (561) 10 % bzw. 100 % innerhalb der ROI für das Ausbleichen von MitoTracker Orange.

## **2.4. Elektronenmikroskopische Methoden**

### **2.4.1. Präparation und Einbettung von Hefezellen**

Die Präparation und Einbettung der Hefezellen für die Elektronenmikroskopie erfolgte nach einem für Hefe etablierten Protokoll (Bauer *et al.*, 2001). Dazu wurden logarithmisch gewachsene Zellen bei 4 °C in Na-PBS-Puffer gewaschen und für 30 min in Fixierpuffer mit 2 % Glutaraldehyd fixiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M Na-Cacodylat mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> erfolgte der enzymatische Verdau der Zellwand mit Zymolyase 20T (Seikagaku Biobusiness, Tokyo, Japan) für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen erneut mit Cacodylat-Puffer gewaschen und zweimal für 5 min bei 4 °C in 0,5 % Osmiumtetroxid und 0,8 % Kaliumferrocyanid inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in ddH<sub>2</sub>O wurden die Zellpellets in 2 % Agar Noble (Difco™ BD, Sparks, MD, USA) eingebettet, in kleine Blöckchen geschnitten und bei 4 °C über Nacht in 1 % Uranylacetat-Lösung kontrastiert. Im Anschluss wurden die Proben in einer Ethanolreihe mit ansteigenden Konzentrationen entwässert und in Epon eingebettet.

### **2.4.2. Standardelektronenmikroskopie und Elektronentomographie**

Aus den in Epon eingebetteten Proben wurden mit einem Diamantmesser (DiATOME, Biel, Schweiz) ca. 60 nm dünne Schnittbänder am Ultracut UCT Ultramikrotom (Leica Microsystems) hergestellt. Die Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte erfolgte für 30 min mit 2 % Uranylacetat in ddH<sub>2</sub>O und für 3 min mit Bleicitrat (Reynolds, 1963). Die Proben wurden bei 80 kV in einem JEM-2100 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) oder einem CEM 902 A (Carl Zeiss) Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Zur Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde eine 1 350 x 1 050 Pixel Erlangshen ES500W CCD Kamera (Gatan, Pleasanton, CA, USA) und die Digital Micrograph Software Version

1.80.70 (Gatan) verwendet. Für die Elektronentomographie wurden am JEM-2100 Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Kippserien ( $\pm 60^\circ$ ) von 200-220 nm dünnen Serienschritten erstellt. Hierzu wurde das Mikroskop bei 200 kV betrieben und eine 4 080 x 4 080 Pixel UltraScan 4000 CCD Kamera (Gatan) sowie die SerialEM Software (Mastronarde, 2005) verwendet. Mit Hilfe des IMOD Softwarepakets der Version 4.5.7 (Kremer *et al.*, 1996) wurden aus den elektronenmikroskopischen Daten 3D-Tomogramme erstellt und handsegmentierte 3D-Modelle rekonstruiert.

### 2.4.3. Cryo-Elektronenmikroskopie

Die Cryo-Elektronenmikroskopie erfolgte nach einem auf *S. cerevisiae* adaptierten Protokoll (Griffith *et al.*, 2008) der Tokuyasu-Methode (Tokuyasu, 1973). Hierzu wurden logarithmisch gewachsene Zellen mit 2 % PFA/0,2 % GA in 0,1 M PHEM-Puffer fixiert, für 1 h in 1 % Periodsäure inkubiert und in 12 % Gelatine eingebettet. Aus den eingebetteten Proben wurden ca. 1 mm<sup>3</sup> kleine Blöckchen angefertigt, welche über Nacht bei 4 °C mit 2,3 M Saccharose infiltriert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die mit Saccharose infiltrierten Proben wurden mit einem Cryo-Diamantmesser (DiATOME) bei -120 °C am EM UC6i Cryo-Ultramikrotom in Kombination mit einer FC6 Cryo-Kammer (Leica Microsystems) geschnitten und auf Formvar Carbon-beschichtete Kupfergrids übertragen. Anschließend erfolgte die Kontrastierung der Cryo-Schnitte mit 2 % Uranyloxalat (pH 7) und 1,8 % Methylcellulose/0,6 % Uranylacetat (pH 4) für jeweils 10 min bei 4 °C (Griffith *et al.*, 2008). Die Untersuchung der Proben erfolgte bei 80 kV am CEM 902 A (Carl Zeiss) Transmissionselektronenmikroskop.

## 2.5. Bioinformatik, Bildbearbeitung und Software

Die Suche nach Homologien erfolgte mit Hilfe des BLASTp Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990). Phylogenetische Analysen wurden mittels der Clustal W 2.0 Software (Larkin *et al.*, 2007) durchgeführt. Für die Montage der Abbildungen wurde die Leica LAS AF Software Version 2.3.6 (Leica Microsystems) und die Adobe Photoshop CS Software Version 8.0.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) verwendet. Mit Ausnahme von geringfügigen Veränderungen von Helligkeit und Kontrast wurde keine weitere Bildmanipulation durchgeführt. Das Erstellen von Plasmidkarten erfolgte mit der Clone Manager Professional 9 Software (Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA).

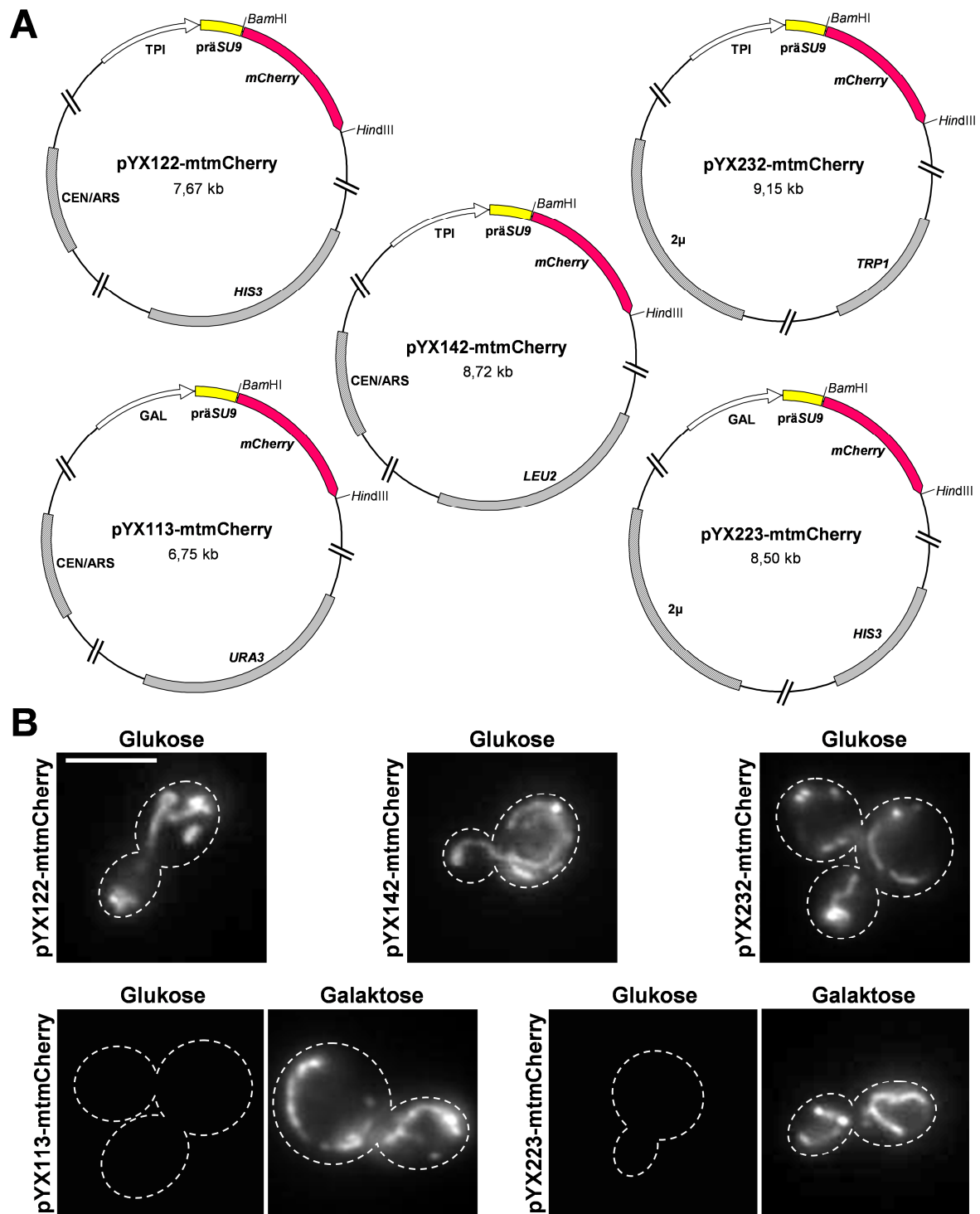
### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Herstellung von Plasmiden zur Fluoreszenzmarkierung zellulärer Strukturen in *S. cerevisiae*

##### 3.1.1. Mitochondriale Reporterkonstrukte mit mCherry als Fluoreszenzmarker

Fluoreszenzproteine, wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria*, sind wichtige zellbiologische Werkzeuge, die sowohl zur Lokalisierung von Proteinen als auch zur Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen verwendet werden. Für die Verwendung von Fluoreszenzproteinen in *S. cerevisiae* kann auf eine Vielzahl von Plasmiden zurückgegriffen werden (Westermann und Neupert, 2000; Janke *et al.*, 2004; Alberti *et al.*, 2007). In mitochondrialen Reporterkonstrukten für *S. cerevisiae* ist GFP ein häufig verwendeter Marker (Westermann und Neupert, 2000). Da GFP auch sehr häufig zur Markierung von mitochondrial assoziierten Proteinen verwendet wird, benötigt man für die Lokalisierung dieser Proteine an den Mitochondrien gleichzeitig einen andersfarbigen mitochondrialen Fluoreszenzmarker.

Um Mitochondrien mit einem rot fluoreszierenden Protein markieren zu können, wurde jeweils die GFP-codierende Sequenz in den von Westermann und Neupert (2000) beschriebenen pYX-Plasmiden durch die Sequenz von mCherry (Shaner *et al.*, 2004) ersetzt. Das schnellreifende Fluoreszenzprotein mCherry verfügt über eine hohe Photostabilität (Shaner *et al.*, 2004) und eignet sich als Monomer sehr gut für die Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien. Auf diese Weise wurden für *S. cerevisiae* fünf neue mitochondriale Reporterplasmide mit mCherry als Fluoreszenzmarker hergestellt (Abb. 3-1 A; Klonierungsstrategien sind ausführlich in Abschnitt 2.2 beschrieben). Die hergestellten Reporterkonstrukte verfügen über verschiedene konstitutive oder induzierbare Promotoren sowie unterschiedliche Auxotrophiemarker für die Transformation in *S. cerevisiae*. Letztere ermöglichen die Verwendung der Plasmide in einer Vielzahl verschiedener genetischer Hintergründe. Nach der Transformation in den wildtypischen Hefestamm YPH500 (Sikorski und Hieter, 1989) konnte bei allen mitochondrialen Reporterkonstrukten eine intensive Rotfluoreszenz des tubulären Mitochondriennetzwerkes beobachtet werden (Abb. 3-1 B). Mit Hilfe der Plasmide pYX113-mtmCherry und pYX223-mtmCherry wurde der mitochondriale Marker mtmCherry, ein Fusionsprotein aus mitochondrialer Zielsequenz und mCherry, unter der Kontrolle des *GAL*-Promotors exprimiert. Dadurch war die Fluoreszenzmarkierung der



**Abb. 3-1: Mitochondriale Reporterkonstrukte für die Markierung der Mitochondrien in *S. cerevisiae* mit mCherry.** (A) Dargestellt sind die pYX-Plasmide, in welche die codierende Sequenz von mCherry (pink markiert) kloniert wurde. Weiße Pfeile stellen Promotoren dar. Schraffierte Felder markieren den entsprechenden hefespezifischen Replikationsursprung. Auxotrophiemarker für die Transformation in *S. cerevisiae* sind durch dunkelgraue Felder dargestellt. prä SU9, mitochondriale Präsequenz der Untereinheit 9 von der  $F_0$ -ATPase aus *Neurospora crassa* (Westermann und Neupert, 2000). Für die Klonierung verwendete Restriktionsenzyme sind gekennzeichnet. Unbekannte Sequenzbereiche sind durch eine unterbrochene Linie dargestellt. Die abgebildeten Plasmidkarten sind nicht maßstabsgetreu gezeichnet. (B) Kontrolle der Funktionalität der hergestellten Plasmide. Wildtypische Hefezellen wurden mit dem jeweiligen Plasmid transformiert, bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Minimalmedium mit Glukose bzw. Galaktose kultiviert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen die mit mCherry markierten Mitochondrien in einer Zellebene. Für die Aufnahmen wurden identische Belichtungszeiten verwendet. Weiße Strichlinien markieren den Umriss der Zellen. Der Maßstab entspricht 5  $\mu$ m.

Mitochondrien ausschließlich während des Wachstums der Hefen in Minimalmedium mit Galaktose zu beobachten. Während des Wachstums in glukosehaltigem Minimalmedium wurde die Expression des mitochondrialen Markers vollständig unterdrückt. Erwartungsgemäß konnte unter diesen Bedingungen kein mitochondriales Fluoreszenzsignal beobachtet werden (Abb. 3-1 B).

Demzufolge sind alle hier beschriebenen Reporterplasmide funktionell und für die spezifische Markierung von Mitochondrien in *S. cerevisiae* mit dem roten Fluoreszenzprotein mCherry ideal geeignet.

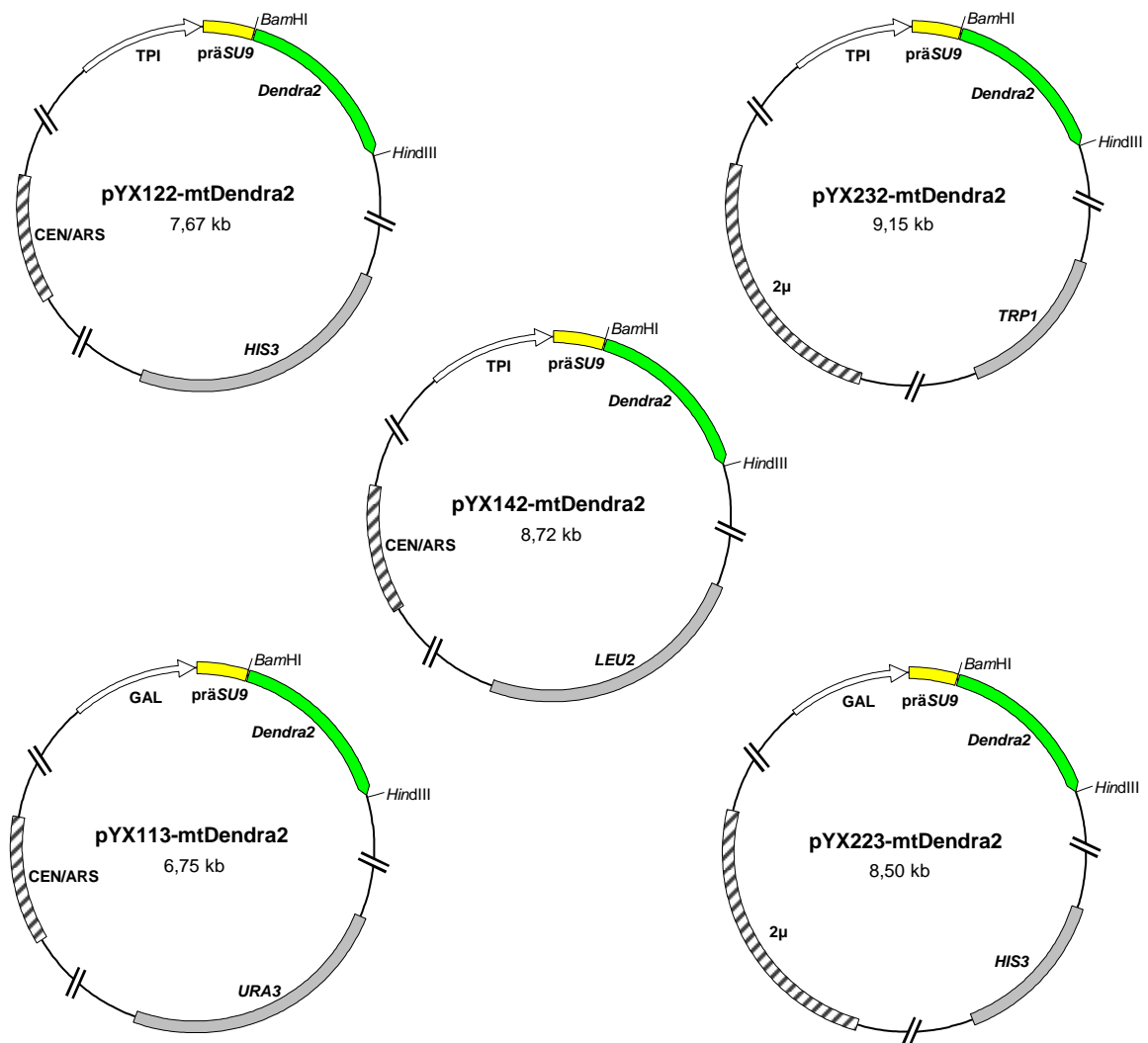
### **3.1.2. Visualisierung der Dynamik von Mitochondrien und mitochondrialen Nukleoiden in *S. cerevisiae* mit Hilfe der Photokonversion von Dendra2**

Durch die Entdeckung von GFP (Shimomura *et al.*, 1962; Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994; Tsien, 1998; Shimomura, 2005) und dem damit verbundenen genetischen Engineering anderer Fluoreszenzproteine (Lippincott-Schwartz und Patterson, 2003; Verkhusha und Lukyanov, 2004) ist insbesondere im letzten Jahrzehnt eine große Vielzahl verschiedenfarbiger Fluoreszenzproteine verfügbar geworden. Hierzu gehören auch zahlreiche photoaktivierbare bzw. photokonvertierbare Fluoreszenzproteine (Lukyanov *et al.*, 2005; Lippincott-Schwartz und Patterson, 2008; Chudakov *et al.*, 2010) wie zum Beispiel die beiden grün-zu-rot konvertierbaren Proteine Dendra2 (Gurskaya *et al.*, 2006) und mEos2 (McKinney *et al.*, 2009).

Um die bestehende Auswahl der mitochondrialen Reporterkonstrukte hinsichtlich der Verwendung von photokonvertierbaren Fluoreszenzproteinen in *S. cerevisiae* zu erweitern, wurde in den von Westermann und Neupert (2000) beschriebenen pYX-Plasmiden die codierende Sequenz von GFP gegen die codierende Sequenz von Dendra2 ersetzt (Abb. 3-2; detaillierte Klonierungsstrategien sind in Abschnitt 2.2 beschrieben). Die fünf auf diese Weise hergestellten mitochondrialen Reporterkonstrukte ermöglichen es, ein Fusionsprotein bestehend aus mitochondrialer Zielsequenz und Dendra2 (mtDendra2) unter der Kontrolle verschiedener konstitutiver oder induzierbarer Promotoren in *S. cerevisiae* zu exprimieren. Die Funktionalität der einzelnen Plasmide wurde nach der Transformation in den wildtypischen Hefestamm YPH500 (Sikorski und Hieter, 1989) fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert. Jedes der getesteten Reporterplasmide war funktionell und führte in den transformierten Hefen zu einer intensiven, grün-zu-rot photokonvertierbaren Fluoreszenzmarkierung der Mitochondrien (siehe Abb. 3-3 für ein repräsentatives Beispiel).



Demzufolge konnten die Mitochondrien durch Verwendung der hier beschriebenen Plasmide spezifisch mit Dendra2 markiert und die Dynamik individueller Mitochondrien durch die Photokonversion von Dendra2 untersucht werden. Ein detailliertes Protokoll für die Photokonversion von Dendra2 wird im weiteren Verlauf beschrieben und anhand eines repräsentativen Beispiels, YPH500 transformiert mit dem Plasmid pYX232-mtDendra2 (Abb. 3-2; Scholz *et al.*, 2013), in Abbildung 3-3 dargestellt.



**Abb. 3-2: Mitochondriale Reporterkonstrukte für die Fluoreszenzmarkierung der Mitochondrien in *S. cerevisiae* mit Dendra2.** Dargestellt sind die Plasmidkarten der verschiedenen Reporterplasmide. Weiße Pfeile stellen Promotoren dar. Schraffierte Felder markieren den entsprechenden hefespezifischen Replikationsursprung. Die für die Transformation in *S. cerevisiae* notwendigen Auxotrophiemarker sind durch dunkelgraue Felder dargestellt. präSU9, mitochondriale Präsequenz der Untereinheit 9 von der F<sub>0</sub>-ATPase aus *Neurospora crassa* (Westermann und Neupert, 2000). Die codierende Sequenz von Dendra2 ist grün hervorgehoben. Die Schnittstellen für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III sind gekennzeichnet. Unbekannte Sequenzbereiche der pYX-Vektoren sind durch eine unterbrochene Linie dargestellt. Die abgebildeten Plasmidkarten sind nicht maßstabsgetreu gezeichnet.

Mitochondrien sind wie die meisten membrangebundenen Organellen eukaryotischer Zellen sehr dynamisch. Eine wichtige Methode für die Untersuchung der mitochondrialen Dynamik ist die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen (Jakobs, 2006). Mit Hilfe dieser Methode können sowohl sehr schnell ablaufende Prozesse (z. B. mitochondriale Fusions- oder Teilungsereignisse) aber auch langandauernde Ereignisse (z. B. der mitochondriale Transport in den Axonen von Nervenzellen oder die Vererbung von Mitochondrien) untersucht werden.

Um das dynamische Verhalten individueller Mitochondrien in Hefezellen mittels Photokonversion von Dendra2 zu untersuchen, wurden wildtypische Hefezellen mit dem Plasmid pYX232-mtDendra2 (Abb. 3-2; Scholz *et al.*, 2013) transformiert, bis zur logarithmischen Wachstumsphase in glukosehaltigem Minimalmedium angezogen und mittels konfokaler 3D-Mikroskopie analysiert. Der Photokonversionsassay erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Schritten (Abb. 3-3 A). Nach Aufnahme eines initialen z-Stapels wurde die Photokonversion von Dendra2 mit Hilfe eines UV-Lasers in einer definierten Region (ROI, *region of interest*) durchgeführt. In diesem Schritt konnten entweder individuelle Mitochondrien oder eine beliebige Subpopulation von Mitochondrien innerhalb einer Zelle spezifisch ausgewählt werden. Unmittelbar im Anschluss an die Photokonversion von Dendra2 wurden weitere z-Stapel in definierten Zeitabständen aufgenommen. Durch die Überlagerung der unkonvertierten und konvertierten Signale konnte die mitochondriale Bewegung analysiert und die Fusion von Mitochondrien beobachtet werden (Abb. 3-3 B). Unmittelbar nachdem verschiedenfarbige Mitochondrien fusioniert waren, erfolgte ein schneller Austausch löslicher Matrixbestandteile, welcher sich in der rasanten Durchmischung der Signale des unkonvertierten und konvertierten Dendra2 innerhalb der mitochondrialen Matrix widerspiegelt. Die Photokonversion von Dendra2 ist somit eine elegante Methode für die Untersuchung der mitochondrialen Dynamik und zur Beobachtung von Fusionsereignissen individueller Mitochondrien innerhalb einer spezifischen Zelle.

Um mit Hilfe der Photokonversion von Dendra2 die Verteilung verschiedener Nukleoide innerhalb einer Zelle zu untersuchen, wurde das Plasmid pYX113-Abf2-Dendra2 hergestellt (siehe Abschnitt 2-2 für eine detaillierte Klonierungsstrategie) und für die Transformation des wildtypischen Hefestammes BY4742 (Brachmann *et al.*, 1998) verwendet. Mit Hilfe von pYX113-Abf2-Dendra2 kann ein Fusionsprotein, welches aus dem DNA-bindenden Protein Abf2 und Dendra2 (Abf2-Dendra2) besteht, unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL*-Promotors exprimiert werden. Hierfür wurden die transformierten Zellen zunächst in glukosehaltigem Minimalmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, anschließend in Minimalmedium mit Galaktose überführt und für weitere sechs

Stunden inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben mittels konfokaler 3D-Mikroskopie. Anhand der Expression von Abf2-Dendra2 konnte die Verteilung der mitochondrialen DNA-Nukleotide in den Zellen beobachtet werden (Abb. 3-3 C). Die Nukleotide waren innerhalb der Zellen, mit Ausnahme der kleinen Knospen, gleichmäßig verteilt. Durch die Photokonversion von Abf2-Dendra2 war es möglich, einige Nukleotide spezifisch zu markieren, sodass sie über den gesamten Beobachtungszeitraum in ihrer Bewegung verfolgt und von Nukleoiden, bei denen Abf2-Dendra2 nicht konvertiert wurde, eindeutig unterschieden werden konnten. Interessanterweise bewegten sich die Nukleotide über den gesamten Zeitraum von 45 min nur geringfügig innerhalb der Zellen. Dieses Beispiel zeigt, dass die Photokonversion von Dendra2 auch für die Untersuchung langandauernder Prozesse, wie z. B. die zelluläre Verteilung einzelner Nukleotide oder die Vererbung individueller Mitochondrien, verwendet werden kann.

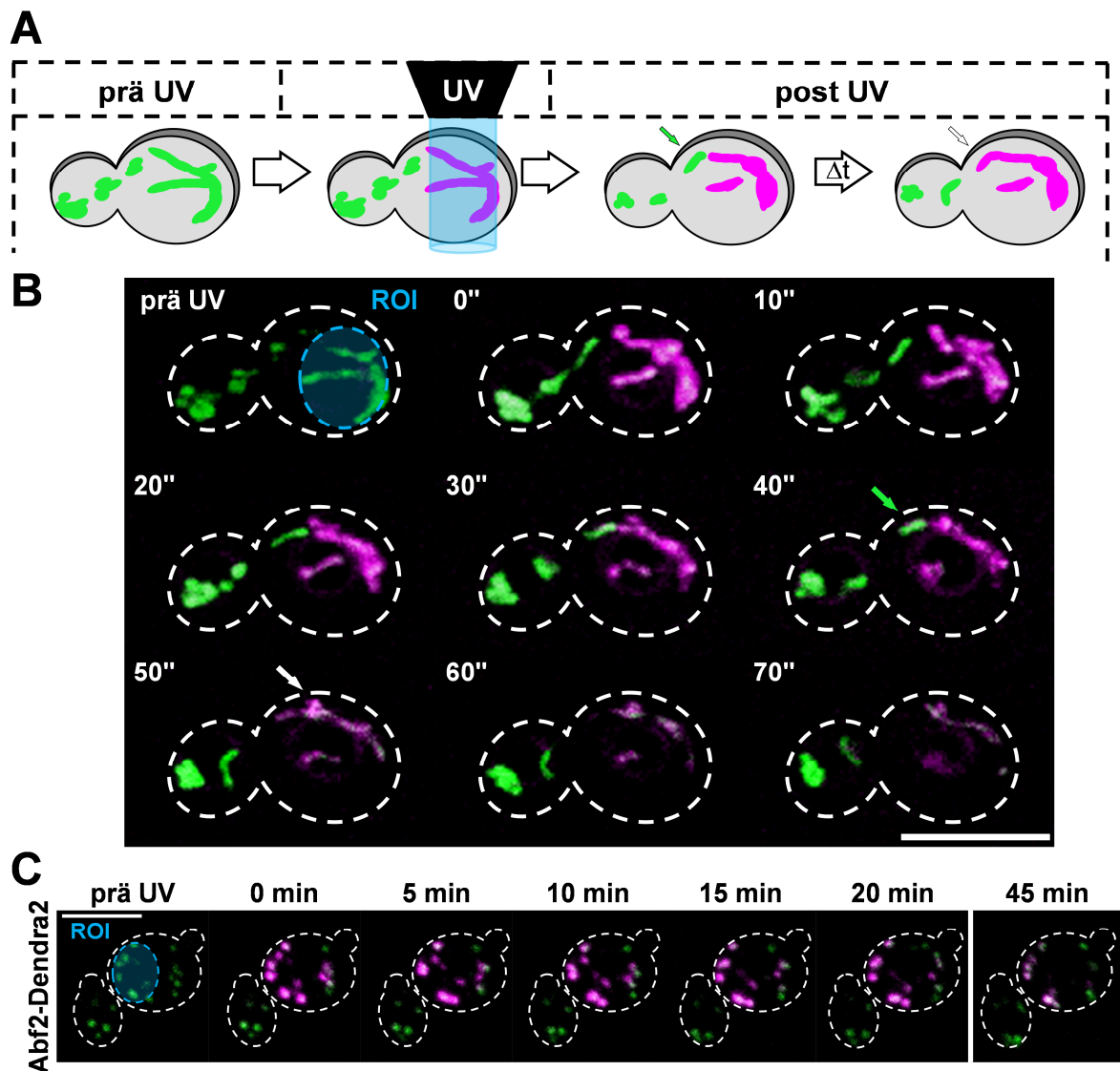


Abb. 3-3: Visualisierung der Dynamik von Mitochondrien und mitochondrialen Nukleoiden mit Hilfe der Photokonversion von Dendra2. (Beschreibung der Abbildung siehe Seite 36.)

**Abb. 3-3: Visualisierung der Dynamik von Mitochondrien und mitochondrialen Nukleoiden mit Hilfe der Photokonversion von Dendra2.** (A) Schematische Darstellung zum Ablauf des Photokonversionsassays am Beispiel der in (B) abgebildeten Zellen. Nach einem initialen Scan (prä UV) erfolgt die Photokonversion von Dendra2 mit Hilfe eines UV-Lasers (UV). Die anschließende Dokumentation der Fluoreszenzsignale des unkonvertierten und konvertierten Dendra2 kann zu individuellen Zeitpunkten erfolgen. (B) Photokonversion von Dendra2 in der mitochondrialen Matrix von Hefezellen. Wildtypische Hefezellen, welche das Plasmid pYX232-mtDendra2 exprimierten, wurden in glukosehaltigem Minimalmedium bis zur logarithmischen Wachstumsphase herangezogen und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Photokonversion erfolgte anhand von sechs Scans innerhalb der markierten Region (ROI). Anschließend wurde die Bewegung der Mitochondrien in Abständen von 10 s beobachtet. Die Bilder sind Projektionen der maximalen Intensität der überlagerten grünen und roten Fluoreszenzsignale. prä UV, Fluoreszenz vor der Photokonversion. Die Pfeile markieren ein mitochondriales Fusionsereignis unmittelbar vor (grüner Pfeil) bzw. direkt nach (weißer Pfeil) der Fusion von zwei verschieden großen Mitochondrien (die Fusion der Mitochondrien wird durch die Vermischung der grünen und magentafarbenen Markierung ersichtlich). Weiße Strichlinien markieren den Umriss der Zellen. Die hier abgebildeten Fluoreszenzaufnahmen sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden und wurden in ähnlicher Form bereits für eine Abbildung in Scholz *et al.* (2013) verwendet. (C) Markierung von individuellen mtDNA-Nukleoiden in *S. cerevisiae* mit Hilfe der Photokonversion von Dendra2. Die Kultivierung der wildtypischen Hefezellen, welche mit dem Plasmid pYX113-Abf2-Dendra2 transformiert wurden, erfolgte zunächst in glukosehaltigem Minimalmedium. Für die Expression von Abf2-Dendra2 wurden die Zellen in Minimalmedium mit Galaktose überführt und für weitere sechs Stunden in diesem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht und die Verteilung der mitochondrialen Nukleoide beobachtet. Die Photokonversion erfolgte nach der zuvor beschriebenen Vorgehensweise anhand von drei Scans innerhalb der markierten Region (ROI). Im Anschluss wurde die Bewegung der Nukleoide in Abständen von 5 min verfolgt. Die Aufnahmen sind Projektionen der maximalen Intensität der überlagerten grünen und roten Fluoreszenzsignale von z-Stapeln mit sechs Ebenen. prä UV, Fluoreszenz vor der Photokonversion. Die Strichlinien markieren den Umriss der Zellen. Sämtliche Größenmaßstäbe entsprechen 5 µm.

Klassische Fusionsassays basieren auf der Färbung der Mitochondrien verschiedener Zellen mit Hilfe verschiedenfarbiger Fluoreszenzproteine oder Vitalfluoreszenzfarbstoffe gefolgt von der anschließenden Zellfusion. Die mitochondriale Fusion wird anhand des Vermischens der verschiedenfarbigen Marker nach der Zellfusion ersichtlich. Diese Methode wurde bereits erfolgreich in *S. cerevisiae* (Nunnari *et al.*, 1997) und *C. reinhardtii* (Abschnitt 3.4; Scholz und Westermann, 2013) sowie pflanzlichen Zellkulturen (Sheahan *et al.*, 2005) und Säugerzellen (Legros *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2003; Mattenberger *et al.*, 2003) verwendet. Es bedarf jedoch erheblicher Vorbereitungen, bevor die Zellen überhaupt miteinander fusioniert werden können. Bei dem hier verwendeten Photokonversionsassay kann das dynamische Verhalten und insbesondere die Fusion der Mitochondrien unmittelbar untersucht werden, da die aufwendige Vorbereitung der Zellen entfällt. Das Prinzip der Photokonversion diente bereits in einigen Organismen zur Untersuchung der Fusion von Mitochondrien. Hierzu gehören beispielsweise die Photokonversion von GFP unter verringerter Sauerstoffkonzentration in Hefen (Jakobs *et al.*, 2003b) und die Verwendung von Kaede in Zwiebelepidermiszellen (Arimura *et al.*, 2004b) oder von PAGFP in Säugerzellen (Karbowski *et al.*, 2004; Molina und Shirihai, 2009). In einer aktuellen Studie wurde Dendra2 dazu verwendet, Mauslinien mit photokonvertierbaren Mitochondrien herzustellen, um die

mitochondriale Dynamik in verschiedenen Gewebetypen und krankheitsassoziierten Mausmodellen untersuchen zu können (Pham *et al.*, 2012).

Der Photokonversionsassay eignet sich jedoch nicht nur für die Untersuchung dynamischer Ereignisse, die in kurzer Zeit stattfinden. Er kann auch sehr gut für die Untersuchung langandauernder Prozesse verwendet werden. So konnte beispielsweise durch die Expression von Abf2-Dendra2 die Verteilung von individuellen Nukleoiden über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Dementsprechend bietet die Photokonversion eine ideale fluoreszenzmikroskopische Methode für die Untersuchung der dynamischen Prozesse von Mitochondrien und mtDNA-Nukleoiden. Die hier präsentierten Plasmide stellen in diesem Zusammenhang ein vielseitiges und für *S. cerevisiae* optimiertes System dar.

### **3.1.3. Herstellung von Gateway-Plasmiden mit den Fluoreszenzmarkern mEos2, Dendra2 und E2-Crimson**

Die Gateway-Klonierung ist im Vergleich zu herkömmlichen Klonierungsstrategien eine sehr effiziente Klonierungstechnik, die auf dem spezifischen Rekombinationssystem des Phagen  $\lambda$  basiert (Hartley *et al.*, 2000; Walhout *et al.*, 2000). Aufgrund der einfachen Handhabung und der hohen Effizienz kommt die Gateway-Technologie bei einer Vielzahl verschiedener Modellorganismen zum Einsatz. Für *S. cerevisiae* existiert eine umfangreiche Sammlung von Gateway-Plasmiden, welche die Verwendung verschiedener Kombinationen von Auxotrophiemarkern, konstitutiven oder induzierbaren Promotoren und häufig verwendeten Markern für die Herstellung von N- oder C-terminal markierten Fusionsproteinen ermöglichen (Alberti *et al.*, 2007).

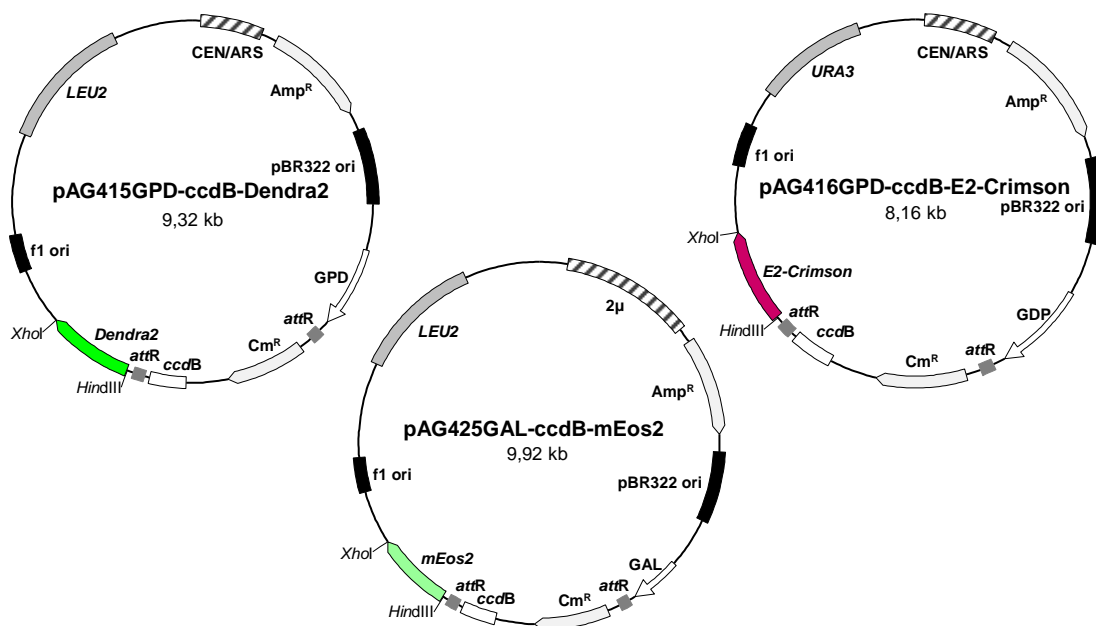
Um diese Sammlung von hefespezifischen Gateway-Vektoren mit zusätzlichen Markern zu erweitern, wurde ein Teil der von Alberti *et al.* (2007) hergestellten Plasmide mit den photokonvertierbaren Fluoreszenzmarkern Dendra2 (Gurskaya *et al.*, 2006) bzw. mEos2 (McKinney *et al.*, 2009) oder dem im tiefroten Spektrum fluoreszierenden E2-Crimson (Strack *et al.*, 2009) ausgestattet. Hierfür wurde in den verwendeten Gateway-Plasmiden jeweils die codierende Sequenz von EGFP gegen die codierende Sequenz der neuen Fluoreszenzmarker ersetzt (siehe Abschnitt 2-2 für ausführliche Informationen zur Klonierung). Eine Übersicht der auf diese Weise neu hergestellten Gateway-Plasmide ist in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

**Tab. 3-1: Eigenschaften der für *S. cerevisiae* neu hergestellten Gateway-Plasmide.**

Plasmid	Selektionsmarker	Promotor	hefespezifischer Replikationsursprung
pAG415GAL-ccdB-Dendra2	LEU2, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GAL	CEN/ARS
pAG425GAL-ccdB-Dendra2	LEU2, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GAL	2μ
pAG415GPD-ccdB-Dendra2*	LEU2, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GPD	CEN/ARS
pAG425GPD-ccdB-Dendra2	LEU2, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GPD	2μ
pAG426GAL-ccdB-Dendra2	URA3, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GAL	2μ
pAG416GPD-ccdB-Dendra2	URA3, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GPD	CEN/ARS
pAG415GAL-ccdB-mEos2	LEU2, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GAL	CEN/ARS
pAG425GAL-ccdB-mEos2*	LEU2, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GAL	2μ
pAG415GPD-ccdB-mEos2	LEU2, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GPD	CEN/ARS
pAG425GPD-ccdB-mEos2	LEU2, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GPD	2μ
pAG416GAL-ccdB-mEos2	URA3, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GAL	CEN/ARS
pAG426GAL-ccdB-mEos2	URA3, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GAL	2μ
pAG416GPD-ccdB-mEos2	URA3, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GPD	CEN/ARS
pAG416GPD-ccdB-E2-Crimson*	URA3, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	GPD	CEN/ARS

\* Die Plasmidkarten dieser exemplarisch ausgewählten Plasmide sind in Abb. 3-4 dargestellt.

Bei allen in Tabelle 3-1 aufgelisteten Plasmiden konnte die korrekte Insertion der jeweiligen Fluoreszenzmarker durch Sequenzierung des entsprechenden Sequenzbereichs (SeqLab Göttingen, Göttingen, Deutschland) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 3-4 sind die Plasmidkarten für drei exemplarisch ausgewählte Gateway-Plasmide dargestellt.



**Abb. 3-4: Hefespezifische Gateway-Plasmide mit den neuen Fluoreszenzmarkern Dendra2, mEos2 und E2-Crimson.** Dargestellt sind die Plasmidkarten von drei exemplarisch ausgewählten Gateway-Plasmiden, welche im Verlauf dieser Arbeit neu hergestellt wurden (siehe Tab. 3-1). Weiße Pfeile stellen Promotoren dar. Schraffierte Felder markieren den entsprechenden hefespezifischen Replikationsursprung. Auxotrophiemarker für die Transformation in *S. cerevisiae* sind durch dunkelgraue Felder dargestellt. *attR*-Rekombinationsstellen flankieren die Gateway-spezifische Selektionskassette der pAG-Vektoren (Alberti *et al.*, 2007). Amp<sup>R</sup>, Ampicillinresistenzkassette; Cm<sup>R</sup>, Resistenzkassette für Chloramphenicol (beides Selektionsmarker für *E.coli*). Die neu eingebrachten Fluoreszenzmarker Dendra2, mEos2 und E2-Crimson sind verschieden grün bzw. rot hervorgehoben. Die Schnittstellen der für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme *HindIII* und *XhoI* sind gekennzeichnet. Alle abgebildeten Plasmidkarten sind maßstabsgetreu gezeichnet.

Während die mit Dendra2 bzw. mEos2 ausgestatteten Gateway-Plasmide speziell für die Verwendung im Photokonversionsassay (Abschnitt 3.1.2.) geeignet sind, kann das Plasmid pAG416GPD-ccdB-E2-Crimson aufgrund der Fluoreszenz von E2-Crimson im tiefroten Spektrum (Strack *et al.*, 2009) ideal mit anderen Reporterplasmiden kombiniert werden. Auf Grundlage der Gateway-Technologie lassen sich mit den hier gezeigten Plasmiden leicht beliebige Fusionsproteine mit C-terminaler Dendra2-, mEos2- bzw. E2-Crimson-Markierung herstellen. Durch Einfügen einer N-terminalen Zielsequenz anstelle der Gateway-spezifischen Selektionskassette können diese Vektoren ebenfalls leicht in ein mitochondriales Reporterkonstrukt umgewandelt werden.

Die hier präsentierten Plasmide sind dementsprechend nützliche und vielseitig einsetzbare Konstrukte, welche die Sammlung von hefespezifischen Gateway-Plasmiden um die Fluoreszenzmarker Dendra2, mEos2 und E2-Crimson erweitern.

#### **3.1.4. Plasmide für die Markierung von ORFs im Genom von *S. cerevisiae* mit *Dendra2***

Die genomische Markierung eines spezifischen Gens mit einem Fluoreszenzmarker ist eine gängige Methode für die Expression eines fluoreszenzmarkierten Proteins unter der Kontrolle des jeweils endogenen Promotors. Der wohl größte Vorteil dieser Methode gegenüber der Expression eines fluoreszenzmarkierten Proteins von einem Plasmid ist, dass bei der genomischen Markierung das entsprechend markierte Protein gleichermaßen in allen Zellen vorkommt. Die genomische Markierung mit *GFP* wurde beispielsweise in einer genomweiten Studie zur Lokalisierung sämtlicher Proteine in *S. cerevisiae* verwendet (Huh *et al.*, 2003). Des Weiteren existiert für *S. cerevisiae* eine Sammlung verschiedener Plasmide, mit deren Hilfe zahlreiche gängige Marker mittels PCR amplifiziert und durch homologe Rekombination ins Genome eingebracht werden können (Janke *et al.*, 2004).

Um individuelle Proteine in *S. cerevisiae* durch die genomischen Markierung der entsprechenden Gene mit Dendra2 markieren zu können, wurden die Plasmide pYM28-Dendra2 und pYM28-3xDendra2 (Abb. 3-5 A, siehe Abschnitt 2-2 für die jeweils verwendete Klonierungsstrategie) konstruiert. Von diesen Plasmiden lassen sich nach dem von Janke *et al.* (2004) beschriebenen Protokoll PCR-Fragmente amplifizieren, welche aus der codierenden Sequenz von Dendra2 bzw. einer 3xDendra2-Kassette sowie einer für die Selektion notwendigen *HIS3MX6*-Kassette besteht. Je nach Sequenz der für die Amplifikation des PCR-Fragments verwendeten Primer kann jedes beliebige Gen am 3'-Ende markiert werden. Getestet wurde die Funktionalität der hier hergestellten Plasmide, indem *ATP3*,

welches für die  $\gamma$ -Untereinheit der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP-Synthase codiert, im Genom eines wildtypischen Hefestammes markiert wurde. In Abbildung 3-5 B ist die genomische Markierung des wildtypischen *ATP3*-Gens exemplarisch am Beispiel von *ATP3-3xDendra2* dargestellt (siehe Abschnitt 2-2 für detaillierte Informationen zur Herstellung des Stammes BY4742 *ATP3-3xDendra2*). Die Zellen des Stammes BY4742 *ATP3-3xDendra2* zeigten beim Wachstum in YPG-Medium (mit Glycerin als nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle) keinen Wachstumsdefekt. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung dieser Zellen konnte eine intensive, grün-zu-rot konvertierbare Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien mit einer wildtypischen Morphologie beobachtet werden (Abb. 3-5 C). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die genomische Markierung von *ATP3* weder einen Einfluss auf die Funktionalität von Atp3 noch auf die mitochondriale Morphologie hatte. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für Zellen des Stammes BY4742 *ATP3-Dendra2*, der auf Grundlage von pYM28-Dendra2 hergestellt wurde, gemacht werden. Jedoch war bei diesen Zellen die Fluoreszenzintensität wesentlich geringer (Daten nicht gezeigt). Die hier hergestellten Plasmide pYM28-Dendra2 und pYM28-3xDendra2 sind dementsprechend sehr nützliche Werkzeuge für die genomische Markierung eines beliebigen Gens in *S. cerevisiae*.

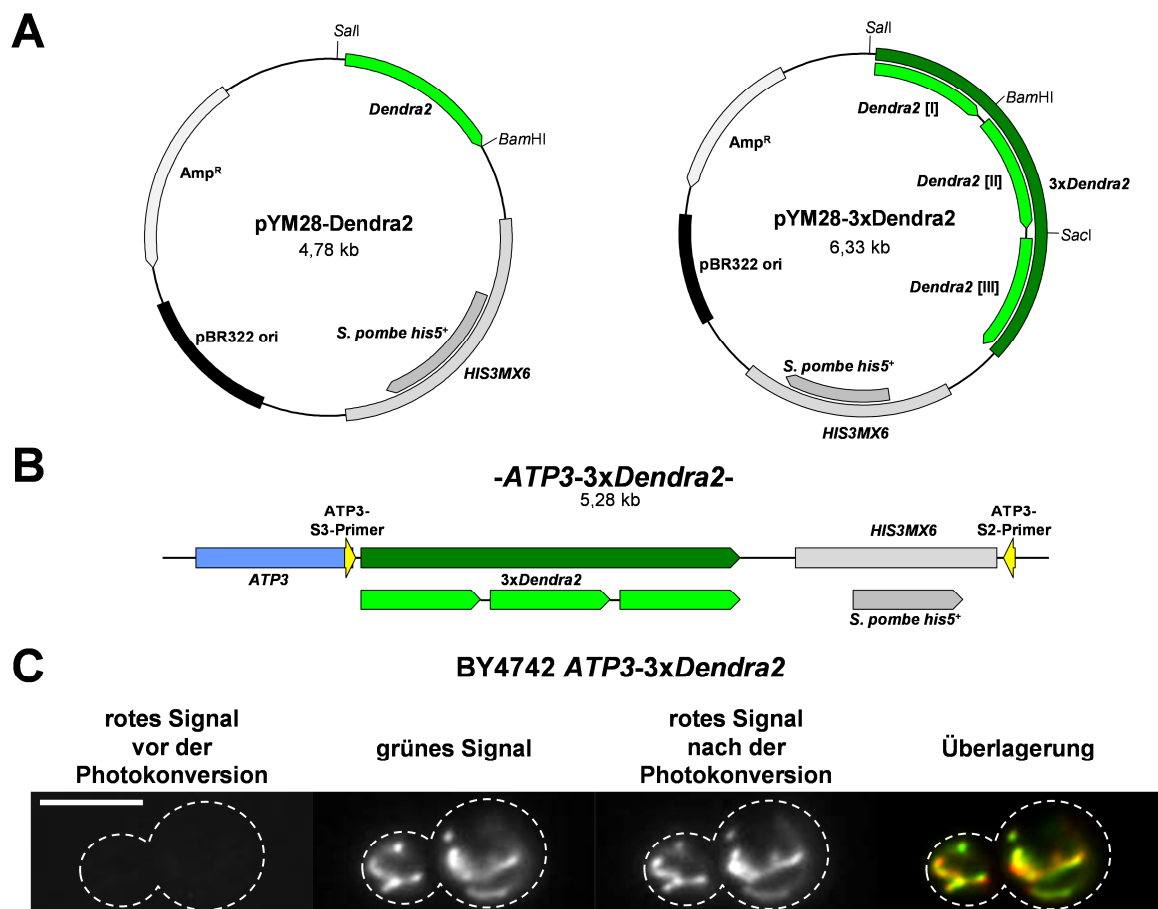


Abb. 3-5: Plasmide für die genomische Markierung individueller Gene in *S. cerevisiae* mit *Dendra2*. (Beschreibung der Abbildung siehe Seite 41.)



**Abb. 3-5: Plasmide für die genomische Markierung individueller Gene in *S. cerevisiae* mit Dendra2.** (A) Dargestellt sind die Plasmidkarten von pYM28-Dendra2 und pYM28-3xDendra2. Die für Dendra2 bzw. ein Fusionsprotein aus drei aufeinanderfolgenden Dendra2-Molekülen (3xDendra2) codierenden Sequenzen sind grün hervorgehoben. *HIS3MX6*, hefespezifischer Auxotrophiemarker mit dem *Schizosaccharomyces pombe his5<sup>+</sup>* Gen für die Selektion in *S. cerevisiae*; Amp<sup>R</sup>, Ampicillin-resistenzkassette. Die Schnittstellen der für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme sind gekennzeichnet. Aufgrund der verwendeten Klonierungsstrategie (siehe Abschnitt 2-2) ging die Schnittstelle am 3'-Ende der 3xDendra2-Kassette in pYM28-3xDendra2 verloren. Die abgebildeten Plasmidkarten sind maßstabsgetreu gezeichnet. (B) Genomische Markierung von *ATP3* mit 3xDendra2. Der abgebildete Sequenzbereich zeigt das PCR-Fragment, welches nach der von Janke *et al.* (2004) beschriebenen Methode mit den angegebenen Primern (gelbe Pfeile) von pYM28-3xDendra2 (A) amplifiziert und durch homologe Rekombination am 3'-Ende von *ATP3* (blau) integriert wurde. (C) Photokonversion des Atp3-3xDendra2-Fusionsproteins. Zellen des Stammes BY4742 *ATP3-3xDendra2* wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPG-Medium kultiviert und an einem Epifluoreszenzmikroskop untersucht. Die Photokonversion des Atp3-3xDendra2-Fusionsproteins erfolgte nach der Aufnahme der unkonvertierten Fluoreszenzsignale durch die Bestrahlung mit blauem Licht. Die Fluoreszenzaufnahmen, welche unmittelbar nacheinander aufgenommen wurden, zeigen die durch Atp3-3xDendra2 markierten Mitochondrien in einer Zellebene. Weiße Stichlinien markieren den Umriss der Zellen. Der Maßstab entspricht 5 µm.

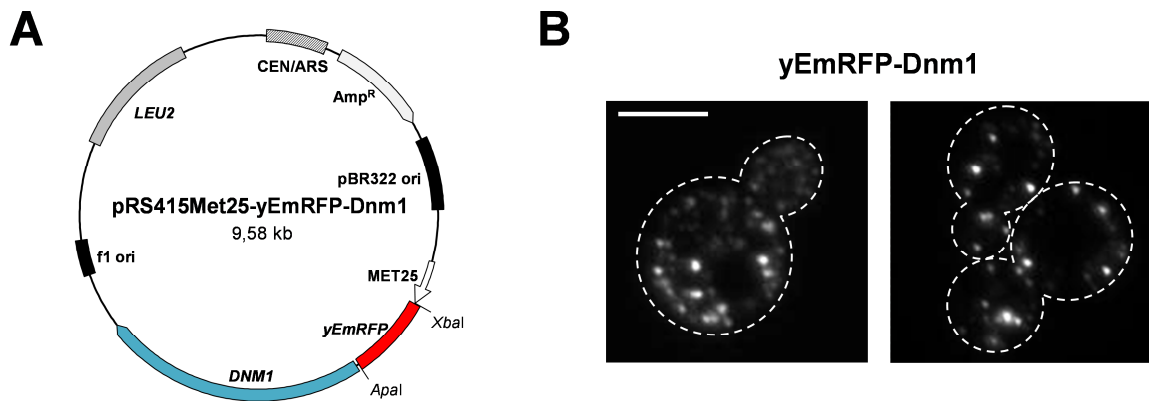
### 3.1.5. Markierung von Dnm1 mit einem rot fluoreszierenden Protein

Das Dynamin-verwandte Protein Dnm1 ist in *S. cerevisiae* die Hauptkomponente der mitochondrialen Teilung (Otsuga *et al.*, 1998). Während die Beteiligung von Dnm1 bei der Teilung der mitochondrialen Außenmembran unumstritten feststeht, sind bisher keine Komponenten für die Teilung der mitochondrialen Innenmembran bekannt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird eine mögliche Beteiligung von Dnm1 bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran untersucht (Abschnitt 3.2.).

Um in Kombination mit dem in Abschnitt 3.1.2. beschriebenen Photokonversionsassay eine mögliche Beteiligung von Dnm1 an der mitochondrialen Innenmembranteilung untersuchen zu können, wurde das Plasmid pRS415Met25-yEmRFP-DNM1 hergestellt (Abb. 3-6). Mit Hilfe dieses Plasmids kann Dnm1 N-terminal mit einem auf Hefe adaptierten mRFP (yEmRFP, Keppler-Ross *et al.*, 2008) markiert werden. Zur Kontrolle des Dnm1-Reporterkonstruktes wurden wildtypische Zellen des Hefestammes YPH500 (Sikorski und Hieter, 1989) mit diesem Plasmid transformiert und bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Minimalmedium mit Glukose herangezogen. Für die Expression des fluoreszenzmarkierten Dnm1 unter Kontrolle des *MET25*-Promotors wurde dem Medium kein Methionin beigefügt. Die mikroskopische Untersuchung der Zellen erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop. Das markierte Dnm1 war anhand von intensiv leuchtenden, punktförmigen Fluoreszenzsignalen zu erkennen (Abb. 3-6 B). Diese punktförmigen Dnm1-Signale waren im Zytosol verteilt und häufig an den Mitochondrien lokalisiert (Abb. 3-6 B; siehe Abschnitt 3.2. für die Kolokalisation von Dnm1 und Mitochondrien). Darüber hinaus konnte durch die

Expression des fluoreszenzmarkierten Dnm1 der mitochondriale Teilungsphänotyp von  $\Delta dnm1$ -Zellen komplementiert werden (siehe Abb. 3-7 A).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das hier präsentierte Plasmid ideal für die Markierung von Dnm1 mit einem rot fluoreszierenden Protein geeignet ist.



**Abb. 3-6: Markierung von Dnm1 in *S. cerevisiae* mit einem rot fluoreszierenden Protein.** (A) Abgebildet ist das Reporterplasmid mit dessen Hilfe Dnm1 (Gensequenz in blau dargestellt) mit einem auf Hefe adaptierten mRFP (yEmRFP, Keppler-Ross *et al.*, 2008) markiert werden kann. Die Expression dieses Fusionsproteins erfolgt unter Kontrolle des induzierbaren *MET25*-Promotors (weißer Pfeil). Das schraffierte Feld markiert den hefespezifischen Replikationsursprung. Der für die Transformation in *S. cerevisiae* notwendige Auxotrophiemarker ist in dunkelgrau dargestellt.  $Amp^R$  markiert die Ampicillinresistenzkassette für die Selektion in *E. coli*. Die Schnittstellen der für die Klonierung dieses Plasmides verwendeten Restriktionsenzyme *XbaI* und *Apal* sind gekennzeichnet. Die abgebildete Plasmidkarte ist maßstabsgetreu gezeichnet. (B) Zelluläre Verteilung des fluoreszenzmarkierten Dnm1 in *S. cerevisiae*. Zellen des wildtypischen Stammes YPH500 (Sikorski und Hieter, 1989), welche das in (A) abgebildete Plasmid trugen, wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in glukosehaltigem Minimalmedium (ohne Methionin) kultiviert und am Epifluoreszenzmikroskop untersucht. Die Bilder sind Aufnahmen einer mittleren Zellebene. Die weißen Strichlinien markieren den Umriss der Zellen. Der abgebildete Maßstab entspricht 5  $\mu m$ .

Insgesamt sind die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide ein optimiertes und vielseitig einsetzbares System von Hefektoren, welche sich insbesondere für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Morphologie und Dynamik in *S. cerevisiae* eignen.

## 3.2. Untersuchungen zur Rolle von Dnm1 bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran

### 3.2.1. Diskontinuität der mitochondrialen Matrix an der Dnm1-Bindestelle

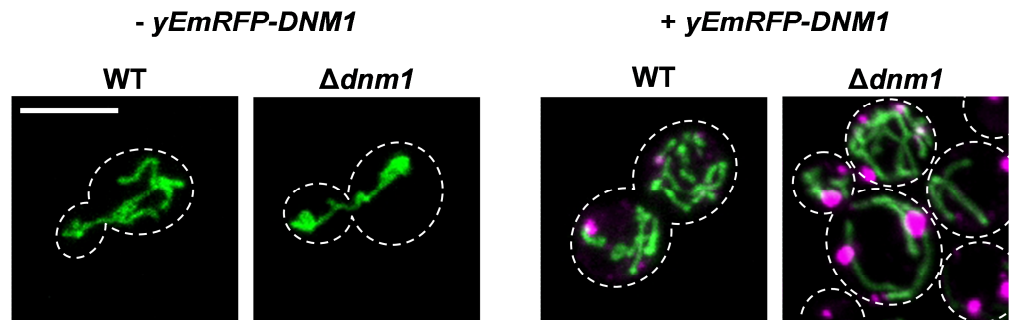
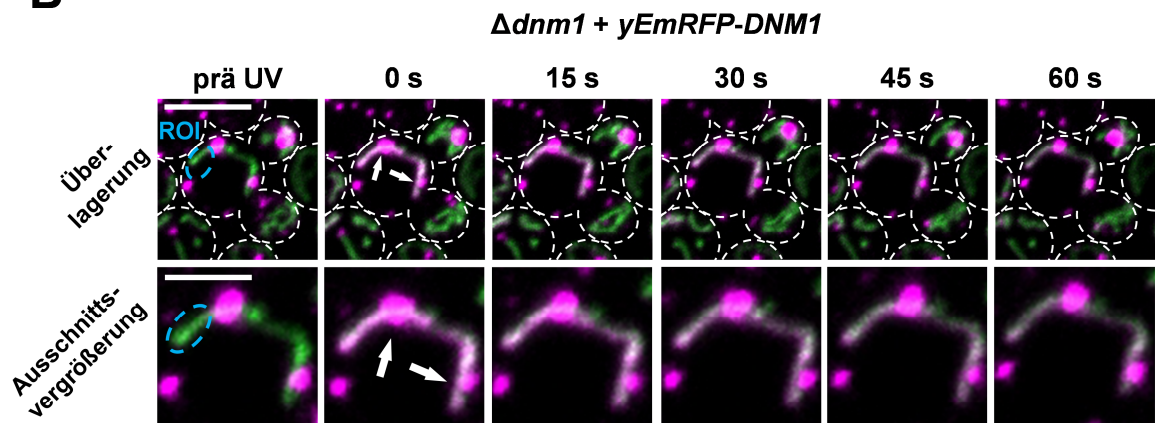
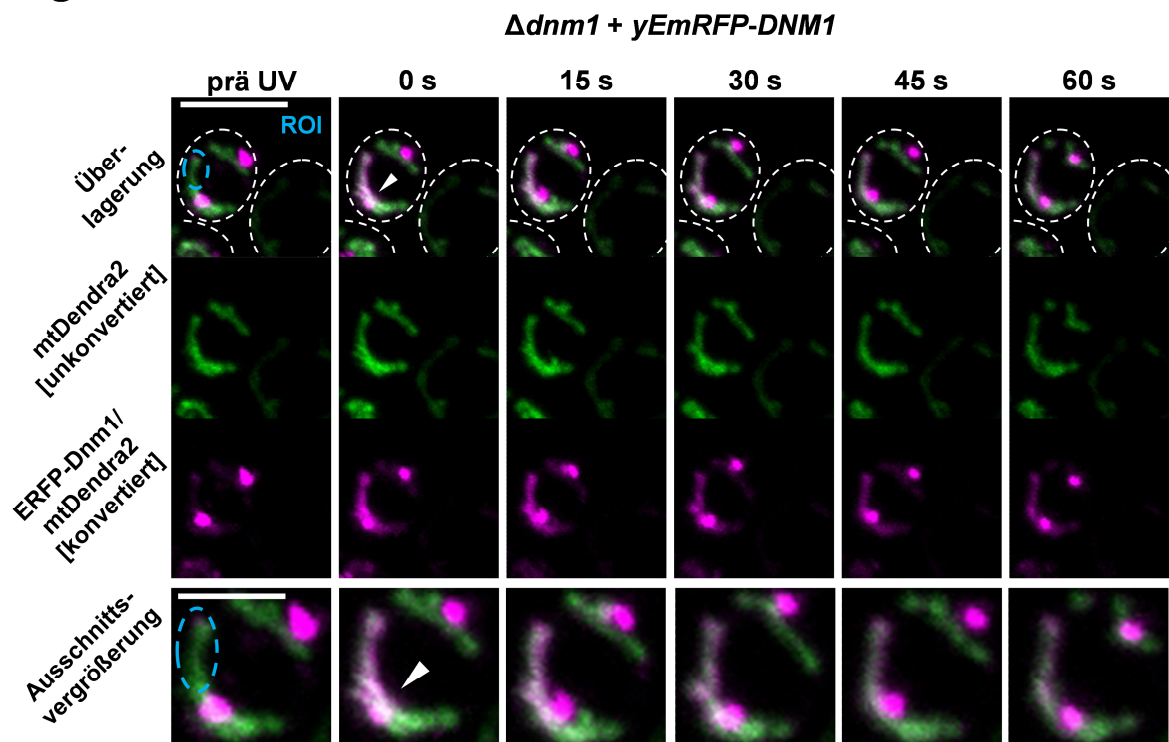
Die mitochondriale Teilung wurde in *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten intensiv untersucht und ein großer Teil der an der mitochondrialen Teilung beteiligten Proteine konnte bereits identifiziert werden (Okamoto und Shaw, 2005; Hoppins *et al.*, 2007; Westermann, 2008). Bei der Teilung der Mitochondrien müssen zwei Membranen, die mitochondriale Außenmembran und die Innenmembran der Mitochondrien, geteilt werden. Während die Teilung der mitochondrialen Außenmembran bereits sehr gut untersucht wurde, ist bisher nicht bekannt, wie die Teilung der mitochondrialen Innenmembran erfolgt und welche Komponenten an der Innenmembranteilung beteiligt sind. Für die Teilung der mitochondrialen Innenmembran könnte einerseits eine eigenständige Teilungsmaschinerie existieren, andererseits wäre es möglich, dass die Teilung der mitochondrialen Innenmembran durch die Teilungsmaschinerie der mitochondrialen Außenmembran erfolgt.

In *S. cerevisiae* ist Dnm1 die Hauptkomponente der mitochondrialen Teilung (Otsuga *et al.*, 1998; Bleazard *et al.*, 1999). Um eine mögliche Beteiligung von Dnm1 an der Teilung der mitochondrialen Innenmembran nachzuweisen, wurde mit Hilfe des zuvor beschriebenen Photokonversionsassays (Abschnitt 3.1.2.) in Kombination mit dem Dnm1-Reporterplasmid pRS415Met25-yEmRFP-Dnm1 (Abb. 3-6) untersucht, ob sich das in der mitochondrialen Matrix befindliche Dendra2 nach der Photokonversion über die durch yEmRFP-Dnm1 rot markierten Teilungsstellen hinweg ausbreiten kann. Die Funktionalität des Dnm1-Reporterkonstrukts wurde überprüft, indem WT- und  $\Delta dnm1$ -Zellen, welche bereits das Plasmid pYX232-mtDendra2 (Abb. 3-2, Scholz *et al.*, 2013) exprimierten, mit dem Plasmid pRS415Met25-yEmRFP-Dnm1 transformiert wurden. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit logarithmisch gewachsenen Zellen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Das Fusionsprotein yEmRFP-Dnm1 verfügte über ein starkes Fluoreszenzsignal und war in der Lage, den mitochondrialen Teilungsphänotyp der  $\Delta dnm1$ -Mutante zu komplementieren (Abb. 3-7 A). Dementsprechend war Dnm1 durch die N-terminale Markierung mit yEmRFP nicht in seiner Funktionalität gestört.

Für den Photokonversionsassay wurden logarithmisch gewachsene  $\Delta dnm1$ -Zellen verwendet, welche mit pYX232-mtDendra2 und pRS415Met25-yEmRFP-Dnm1 transformiert wurden. Da in diesen Zellen ausschließlich fluoreszenzmarkiertes Dnm1 vorhanden war,

konnten sämtliche Dnm1-Assemblierungen an den Mitochondrien beobachtet werden. Mit Hilfe des Photokonversionsassays wurde untersucht, ob sich die Bindung von Dnm1 an den Mitochondrien auf die Kontinuität der mitochondrialen Matrix und dementsprechend auch auf die mitochondriale Innenmembran auswirkt. Hierfür wurde das in der mitochondrialen Matrix lokalisierte Dendra2 auf einer Seite einer Dnm1-Bindestelle konvertiert und die Ausbreitung des konvertierten Signals in der Matrix verfolgt. Aufgrund der hohen Dynamik von Dnm1 gestaltete es sich jedoch äußerst schwierig, geeignete Dnm1-Bindestellen für die Photokonversion zu finden. Einerseits war die mitochondriale Teilung bereits abgeschlossen, bevor die Photokonversion durchgeführt werden konnte. Andererseits war die mitochondriale Bindung vieler Dnm1-Komplexe nur von sehr kurzer Dauer und nur wenige Dnm1-Komplexe führten auch tatsächlich zur Teilung der Mitochondrien. Bei der überwiegenden Mehrheit der Versuche konnte sich das konvertierte Dendra2 ungehindert über die Dnm1-Bindestellen hinweg innerhalb der mitochondrialen Matrix ausbreiten (Abb. 3-7 B). Jedoch konnte in einem der insgesamt 74 durchgeführten Experimente beobachtet werden, dass das konvertierte Dendra2 sich nicht weiter über die Dnm1-Bindestelle hinaus in der mitochondrialen Matrix ausbreitete (Abb. 3-7 C). Diese Diskontinuität der mitochondrialen Matrix an der Dnm1-Bindestelle wurde jedoch nicht durch ein mitochondriales Teilungsereignis verursacht. Anhand des unkonvertierten Dendra2 ist eindeutig zu erkennen, dass das Mitochondrium an der Dnm1-Bindestelle nicht geteilt wurde. Die vollständige Teilung des Mitochondriums könnte möglicherweise erst im Anschluss an den untersuchten Beobachtungszeitraum erfolgt sein.

Dnm1 kann dementsprechend zu einer Diskontinuität in der mitochondrialen Matrix führen und die Ausbreitung von Dendra2 über die Dnm1-Bindestellen hinweg verhindern, selbst wenn keine Teilung zu beobachten ist und die Teilung der mitochondrialen Außenmembran möglicherweise erst später erfolgt. Um geeignete Dnm1-Bindestellen zuverlässig bestimmen zu können, war ein veränderter experimenteller Versuchsansatz notwendig (siehe Abschnitt 3.2.2.).

**A****B****C**

**Abb. 3-7: Diskontinuität der mitochondrialen Matrix an der Dnm1-Bindestelle.** (Beschreibung der Abbildung siehe Seite 46.)

**Abb. 3-7: Diskontinuität der mitochondrialen Matrix an der Dnm1-Bindestelle.** (A) Bestimmung der mitochondrialen Morphologie in WT- und  $\Delta dnm1$ -Zellen ohne (links) bzw. mit dem Plasmid pRS415Met25-yEmRFP-Dnm1 (rechts). Die Markierung der Mitochondrien erfolgte mit Dendra2, welches mittels mitochondrialer Zielsequenz in die mitochondriale Matrix eingebracht wurde. Die Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in glukosehaltigem Minimalmedium herangezogen und am konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Aufnahmen zeigen die Projektion der maximalen Intensität der Fluoreszenzsignale aus z-Stapeln mit 10 Ebenen. Mitochondrien sind in grün, Dnm1 ist in magenta dargestellt. Die Konturen der Zellen sind durch Strichlinien markiert. (B, C) Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie in (A) beschrieben. Für den Photokonversionsassay wurden  $\Delta dnm1$ -Zellen verwendet, welche mit den Plasmiden pYX232-mtDendra2 und pRS415Met25-yEmRFP-Dnm1 transformiert wurden. Die Photokonversion erfolgte nach der Aufnahme eines initialen z-Stapels (prä UV) anhand von vier Scans mit dem UV-Laser in den blau markierten Regionen (ROI). Anschließend wurde die Ausbreitung des konvertierten Dendra2 in der mitochondrialen Matrix in Abständen von 15 Sekunden verfolgt. Die Aufnahmen sind Projektionen der maximalen Intensität aus überlagerten grünen und roten, grünen oder roten Fluoreszenzsignalen von z-Stapeln mit 10 Ebenen. Grün, unkonvertiertes Dendra2 in der mitochondrialen Matrix; magenta, Dnm1 und konvertiertes Dendra2. Die Pfeile (B) markieren Dnm1-Bindestellen, an denen sich das photokonvertierte Dendra2 ungehindert in der mitochondrialen Matrix ausbreiten konnte. Eine Dnm1-Bindestelle, an welcher das photokonvertierte Dendra2 an der vollständigen Ausbreitung innerhalb der mitochondrialen Matrix gehindert wurde, ist mit Pfeilspitzen (C) markiert. Strichlinien zeigen die Konturen der Zellen. Die Größenmaßstäbe entsprechen 5  $\mu\text{m}$  bzw. 2,5  $\mu\text{m}$  in den Ausschnittsvergrößerungen.

### 3.2.2. *DNM1*<sup>G312D</sup> und *dnm1*<sup>G185S</sup>: Mutationen von *DNM1* homolog zu *shibire*<sup>ts</sup> aus *Drosophila melanogaster*

Das *shibire*-Gen aus *Drosophila melanogaster* codiert Dynamin, welches für die Endozytose von Vesikeln an der Plasmamembran notwendig ist (Chen *et al.*, 1991). In temperatursensitiven *shibire*-Mutanten (*shibire*<sup>ts</sup>) konnte eine reversible Blockierung der Abschnürung von Endozytosevesikeln an der Plasmamembran neuronaler Zellen beobachtet werden (Kosaka und Ikeda, 1983a, b; Koenig und Ikeda, 1989). Bei restriktiver Temperatur bildeten sich stabile Teilungsintermediate der eingeschnürten Plasmamembran, welche nicht zur Abschnürung von Vesikeln führten. Dieser Effekt konnte durch den Transfer zur permissiven Temperatur rückgängig gemacht werden.

Um die Assemblierung von Dnm1 an den Mitochondrien auf ähnliche Weise regulieren zu können, wurden auf Grundlage der Sequenzhomologie zwischen *shibire*<sup>ts</sup> und *DNM1* zwei Varianten von *DNM1* (*DNM1*<sup>G312D</sup> und *dnm1*<sup>G185S</sup>) erzeugt (hergestellt von Sandra Merz-Jakob, AG Westermann, Universität Bayreuth). Um zunächst die Eigenschaften von Dnm1<sup>G312D</sup> und Dnm1<sup>G185S</sup> zu testen, wurden WT- und  $\Delta dnm1$ -Zellen, welche bereits das Plasmid pYX232-mtDendra2 besaßen, zusätzlich mit dem jeweils für Dnm1<sup>G312D</sup> bzw. Dnm1<sup>G185S</sup> codierenden Plasmid transformiert. Die mikroskopische Untersuchung der Transformanten erfolgte mit logarithmisch gewachsenen Zellen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Dnm1<sup>G312D</sup> und Dnm1<sup>G185S</sup> waren im Gegensatz zum homologen Protein aus *Drosophila* nicht temperatursensitiv (Daten nicht gezeigt). Die Assemblierung

von Dnm1<sup>G312D</sup> bzw. Dnm1<sup>G185S</sup> an den Mitochondrien konnte somit nicht durch eine Temperaturveränderung reguliert werden. Unabhängig von der Temperatur, bei welcher die Zellen kultiviert wurden, hatte die Expression von Dnm1<sup>G312D</sup> bzw. Dnm1<sup>G185S</sup> verschiedene Auswirkungen auf die mitochondriale Morphologie. Der Einfluss von Dnm1<sup>G312D</sup> bzw. Dnm1<sup>G185S</sup> auf die mitochondriale Morphologie wurde genauer charakterisiert, um herauszufinden, ob mit Hilfe von Dnm1<sup>G312D</sup> bzw. Dnm1<sup>G185S</sup> und dem zuvor beschriebenen Photokonversionsassay (Abschnitt 3.2.1.) weitere Dnm1-Bindestellen hinsichtlich einer Diskontinuität der mitochondrialen Matrix untersucht werden können.

Dnm1<sup>G312D</sup> war überwiegend im Zytosol lokalisiert und assemblierte nur vereinzelt an den Mitochondrien (Abb. 3-8 A und B). Der mitochondriale Teilungsdefekt der  $\Delta dnm1$ -Mutante konnte durch die Expression von *DNM1*<sup>G312D</sup> nicht gerettet werden (Abb. 3-8 B). Darüber hinaus verursachte Dnm1<sup>G312D</sup> in WT-Zellen die Ausbildung eines großen, netzartig verzweigten Mitochondriums, wie es für die  $\Delta dnm1$ -Mutante typisch ist (Abb. 3-8 A vgl. Abb. 3-7 A). Dementsprechend handelt es sich bei Dnm1<sup>G312D</sup> um eine dominant negative Variante von Dnm1, die nicht zur Teilung der Mitochondrien fähig ist. In den großen, netzartig verzweigten Mitochondrien breitete sich das photokonvertierte Dendra2 unmittelbar nach der Photokonversion ungehindert in der gesamten Matrix aus (Abb. 3-8 B). Aus diesen Gründen eignete sich Dnm1<sup>G312D</sup> nicht für die weitere Untersuchung der Dnm1-Bindestellen mittels Photokonversionsassay.

Im Gegensatz zu Dnm1<sup>G312D</sup> rettete Dnm1<sup>G185S</sup> den mitochondrialen Teilungsdefekt der  $\Delta dnm1$ -Mutante (Abb. 3-8 C vgl. Abb. 3-7 A). Dnm1<sup>G185S</sup> war häufig an den Mitochondrien lokalisiert und blieb fest mit diesen verbunden. Dementsprechend war Dnm1<sup>G185S</sup> ein guter Kandidat dafür, die Diskontinuität der mitochondrialen Matrix an der Dnm1-Bindestelle mit dem zuvor beschriebenen Photokonversionsassay (Abschnitt 3.2.1.) genauer zu untersuchen. Bei drei von insgesamt fünfundzwanzig untersuchten Zellen konnte beobachtet werden, dass Dnm1<sup>G185S</sup> zentral an einem mitochondrialen Tubulus assemblierte und das Fluoreszenzsignal von Dendra2 in der Matrix an diesen mitochondrialen Assemblierungspunkten von Dnm1<sup>G185S</sup> unterbrochen war (Abb. 3-8 C). Nach der Photokonversion, welche nur auf einer Seite der Assemblierungspunkte von Dnm1<sup>G185S</sup> erfolgte, wurde die Ausbreitung des konvertierten Dendra2 an den Assemblierungspunkten verzögert. Die mitochondriale Teilung durch Dnm1<sup>G185S</sup> konnte innerhalb des Untersuchungszeitraums nicht beobachtet werden. Möglicherweise erfolgte die Teilung der Mitochondrien erst nach dem untersuchten Beobachtungszeitraum.

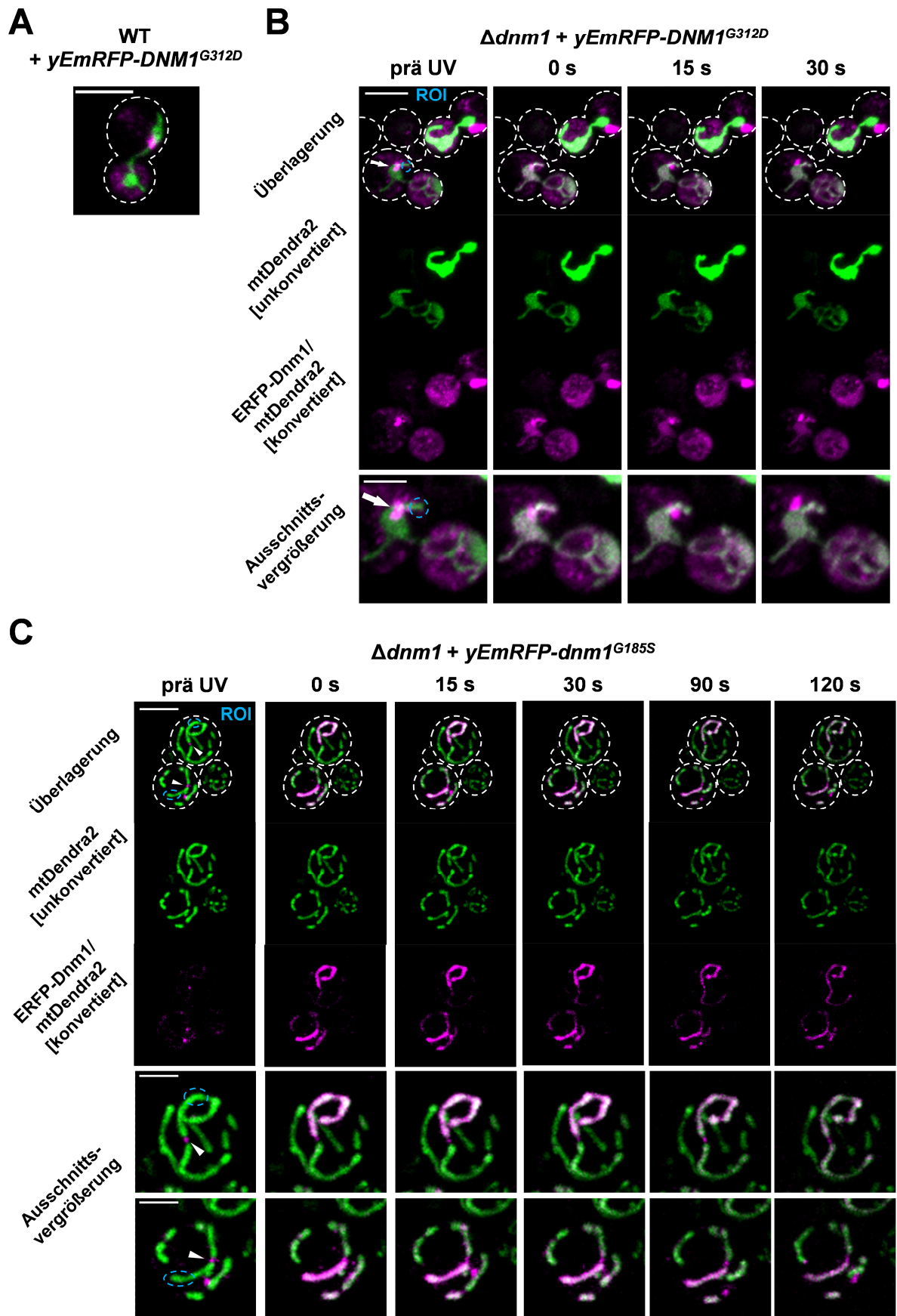


Abb. 3-8: Dnm1-Mutanten zur Untersuchung der Diskontinuität innerhalb der mitochondrialen Matrix an Dnm1-Bindestellen. (Beschreibung der Abbildung siehe Seite 49.)



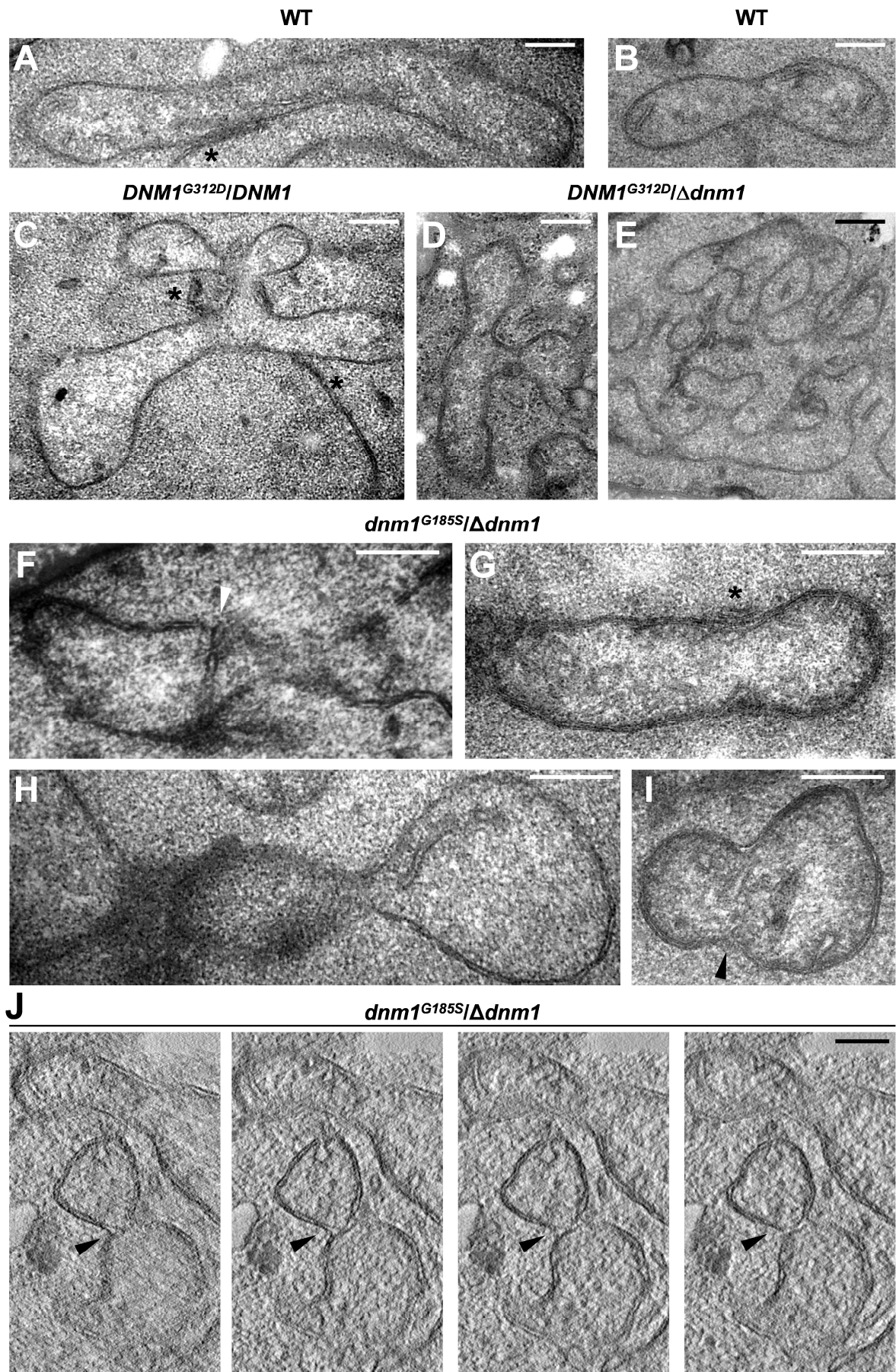
**Abb. 3-8: Dnm1-Mutanten zur Untersuchung der Diskontinuität innerhalb der mitochondrialen Matrix an Dnm1-Bindestellen.** WT- und  $\Delta dnm1$ -Zellen, deren mitochondriale Matrix durch das Plasmid pYX232-mtDendra2 mit Dendra2 markiert war, wurden zusätzlich mit einem Plasmid transformiert, das für yEmRFP-Dnm1<sup>G312D</sup> oder yEmRFP-Dnm1<sup>G185S</sup> codiert. Die Zellen wurden bei 30 °C bis zur logarithmischen Wachstumsphase in glukosehaltigem Minimalmedium herangezogen und am konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Alle Aufnahmen sind Projektionen der maximalen Intensität von überlagerten grünen und roten, grünen oder roten Fluoreszenzsignalen von z-Stapeln mit 10 Ebenen. **(A)** Dnm1<sup>G312D</sup> ist eine dominant negative Dnm1-Variante, die einen mitochondrialen Teilungsdefekt in wildtypischen Zellen verursacht. Mitochondrien sind in grün, Dnm1<sup>G312D</sup> ist in magenta dargestellt. **(B, C)** Für den Photokonversionsassay wurden  $\Delta dnm1$ -Zellen verwendet, deren mitochondriale Matrix mit Dendra2 markiert ist. Zusätzlich hatten diese Zellen ein Plasmid, welches für eine der fluoreszenzmarkierten Dnm1-Varianten Dnm1<sup>G312D</sup> (B) oder Dnm1<sup>G185S</sup> (C) codiert. Die Photokonversion erfolgte wie in Abb. 3-7 beschrieben. Während Dnm1<sup>G312D</sup> die mitochondriale Teilung blockierte und sich das konvertierte Dendra2 ungehindert in der Matrix ausbreiten konnte, wurde die Ausbreitung des konvertierten Dendra2 an den Assemblierungspunkten von Dnm1<sup>G185S</sup> stark verzögert. prä UV, Fluoreszenz vor der Photokonversion; ROI, Bereich in welchem die Photokonversion durchgeführt wurde. Grün, unkonvertiertes Dendra2 in der mitochondrialen Matrix; rot, Dnm1 und konvertiertes Dendra2. Die Pfeile (B) bzw. Pfeilspitzen (C) markieren die Dnm1-Bindestellen. Die Konturen der Zellen sind durch Strichlinien dargestellt. Die Größenmaßstäbe entsprechen 5 µm oder 2,5 µm für Ausschnittsvergrößerungen.

Während das dominant negative Dnm1<sup>G312D</sup> die mitochondriale Teilung blockierte, bewirkte Dnm1<sup>G185S</sup>, dass die Mitochondrien inklusive der mitochondrialen Matrix an den Dnm1<sup>G185S</sup>-Bindestellen stark verengt waren. Anhand des Photokonversionsassays konnte die zuvor bei wildtypischem Dnm1 beobachtete Diskontinuität der mitochondrialen Matrix an einer Dnm1-Bindestelle mit Hilfe von Dnm1<sup>G185S</sup> mehrfach beobachtet werden. Die hier und in Abschnitt 3.2.1. beschriebene Diskontinuität der mitochondrialen Matrix an den Bindestellen von Dnm1 bzw. Dnm1<sup>G185S</sup> deutet darauf hin, dass die mitochondriale Innenmembran an den besagten Bindestellen sehr stark eingeschnürt oder sogar vollständig geteilt ist. Um eine mögliche Ursache für die Diskontinuität der mitochondrialen Matrix zu finden, wurde die Ultrastruktur der Mitochondrien an möglichen Dnm1-Bindestellen mit verschiedenen elektronenmikroskopischen Methoden untersucht (Abschnitt 3.2.3.).

### 3.2.3. Ultrastrukturelle Untersuchung möglicher mitochondrialer Teilungsereignisse in *DNM1*-, *DNM1*<sup>G312D</sup>- und *dnm1*<sup>G185S</sup>-exprimierenden Zellen

Bei der Photokonversion von Dendra2 in der mitochondrialen Matrix konnte mehrfach eine Diskontinuität der Matrix an Dnm1-Bindestellen beobachtet werden (Abb. 3-7 C, Abb. 3-8 C). Um die Ultrastruktur der Mitochondrien an den Dnm1-Bindestellen zu untersuchen und eine Ursache für die Diskontinuität zu finden, wurden *DNM1*-, *DNM1*<sup>G312D</sup>- und *dnm1*<sup>G185S</sup>-exprimierende Zellen elektronenmikroskopisch untersucht. Für jede Probe wurden die Mitochondrien mehrerer hundert Zellen analysiert. Hierbei wurde insbesondere nach Einschnürungen an den Mitochondrien oder Mitochondrien-ER-Kontakten gesucht, da es sich bei diesen Stellen um mögliche Teilungsereignisse handeln könnte. Bei der Expression des wildtypischen *DNM1* zeigten die Mitochondrien eine wildtypische Ultrastruktur (Abb. 3-9 A und B). Einschnürungen konnten an den mitochondrialen Tubuli jedoch nur vereinzelt gefunden werden (Abb. 3-9 B). Die Expression der dominant negativen Variante *DNM1*<sup>G312D</sup> führte in WT- und  $\Delta dnm1$ -Zellen zur Bildung eines großen, zusammenhängenden Mitochondriums (Abb. 3-9 C - E). Die Mitochondrien in *DNM1*<sup>G312D</sup>-exprimierenden Zellen verfügten über Einschnürungen, an welchen vereinzelt das Endoplasmatischen Retikulum zu erkennen war und die Mitochondrien einen Durchmesser von ca. 110 nm besaßen. Aufgrund der dominant negativen Eigenschaft von Dnm1<sup>G312D</sup> ist es jedoch unwahrscheinlich, dass es sich bei allen Einschnürungen um Dnm1-Bindestellen handelt. Eine Diskontinuität der mitochondrialen Matrix war an den Einschnürungen der Mitochondrien in *DNM1*<sup>G312D</sup>-exprimierenden Zellen nicht festzustellen. In *dnm1*<sup>G185S</sup>-exprimierenden  $\Delta dnm1$ -Zellen zeigten die Mitochondrien eine wildtypische Ultrastruktur. Die Mitochondrien dieser Zellen verfügten häufig über Einschnürungen, in deren Nähe elektronendichtes Material innerhalb der Matrix zu sehen war (Abb. 3-9 F - I). In einem Fall waren eindeutig zwei gegenüberliegende Cristae zu erkennen, welche die mitochondriale Matrix unmittelbar neben einer ca. 70 nm schmalen Einschnürung verengten (Abb. 3-9 F). Durch elektronentomographische Untersuchungen von *dnm1*<sup>G185S</sup>-exprimierenden  $\Delta dnm1$ -Zellen wurden Mitochondrien mit zwei getrennten Innenmembranen an einer eingeschnürten mitochondrialen Außenmembran beobachtet (Abb. 3-9 J).

Bei den hier beobachteten Einschnürungen der Mitochondrien könnte es sich möglicherweise um Dnm1-Bindestellen handeln. Dementsprechend könnte die Diskontinuität der mitochondrialen Matrix durch gegenüberliegende Cristae oder eine geteilte Innenmembran verursacht werden.



**Abb. 3-9: Unterbrechungen der mitochondrialen Matrix an Einschnürungen der Mitochondrien.**  
(Beschreibung der Abbildung siehe Seite 52.)



**Abb. 3-9: Unterbrechungen der mitochondrialen Matrix an Einschnürungen der Mitochondrien.** Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die mitochondriale Ultrastruktur und mögliche Dnm1-Bindestellen in Zellen, die wildtypisches *DNM1*, *DNM1*<sup>G312D</sup> oder *dnm1*<sup>G185S</sup> von einem Plasmid exprimierten. (A, B) Die Expression des wildtypischen *DNM1* hatte keinen Einfluss auf die mitochondriale Ultrastruktur wildtypischer Zellen. Einschnürungen der Mitochondrien konnten bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung nur vereinzelt beobachtet werden. Das Endoplasmatische Retikulum (A) ist durch ein Sternchen markiert. (C - E) Bei der Expression der dominant negativen Variante *DNM1*<sup>G312D</sup> in wildtypischen Zellen (C) oder in der  $\Delta$ *dnm1*-Mutante (D, E) wurde ein großes, zusammenhängendes Mitochondrium gebildet. Mehrere Einschnürungen sind zu erkennen. Eine veränderte Ultrastruktur der Innenmembran oder der Matrix konnte nicht beobachtet werden. Die Sternchen in (C) markieren das Endoplasmatische Retikulum, welches zu den Einschnürungen am Mitochondrium ragt. (F - I) In *dnm1*<sup>G185S</sup>-exprimierenden  $\Delta$ *dnm1*-Zellen besitzen Mitochondrien eine wildtypische Ultrastruktur. An manchen Einschnürungen der Mitochondrien konnten elektronendichte Strukturen (Pfeilspitzen) im Inneren der Mitochondrien beobachtet werden. Zwei direkt gegenüberliegende Cristae sind in (F) erkennbar. Das Sternchen (J) Elektronentomographische Untersuchung der Mitochondrien in  $\Delta$ *dnm1*-Zellen, die das rezessive *dnm1*<sup>G185S</sup> exprimierten. Die Aufnahmen sind x/y-Ebenen des selben Tomogramms. Die Pfeilspitzen markieren eine Einschnürung der mitochondrialen Außenmembran. An dieser Einschnürung sind zwei getrennte Innenmembranen erkennbar. Die dargestellten Größenmaßstäbe entsprechen 200 nm.

Durch die Photokonversion von Dendra2 in der mitochondrialen Matrix konnte eine Diskontinuität der mitochondrialen Matrix an den Dnm1-Bindestellen der Mitochondrien beobachtet werden. Bei der ultrastrukturellen Untersuchung von mutmaßlichen Dnm1-Assemblierungspunkten konnten gegenüberstehende Cristae oder die vollständige Teilung der Innenmembran als mögliche Ursachen für die Diskontinuität der mitochondrialen Matrix identifiziert werden. Eine direkte Beteiligung von Dnm1 bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran kann anhand dieser Ergebnisse nicht eindeutig nachgewiesen werden. Offenbar besteht aber ein Zusammenhang zwischen der Assemblierung von Dnm1 an der mitochondrialen Außenmembran und der Kontinuität der mitochondrialen Matrix. In Mitochondrien verschiedener Säugerzelltypen wurde die schnelle und ungehinderte Diffusion von GFP innerhalb der mitochondrialen Matrix beschrieben (Partikian *et al.*, 1998). Durch Photokonversion von Dendra2 konnte auch in *S. cerevisiae* eine schnelle Ausbreitung von Proteinen innerhalb der Matrix gezeigt werden (Abb. 3-3 B; Scholz *et al.*, 2013). Unmittelbar nach der Fusion zweier verschiedenfarbig markierter Mitochondrien erfolgte eine rasante Durchmischung des unkonvertierten und photokonvertierten Dendra2. Eine Bewegungseinschränkung von Dendra2 innerhalb der mitochondrialen Matrix konnte ausschließlich an Stellen beobachtet werden, an denen Dnm1 oder Dnm1<sup>G185S</sup> an den Mitochondrien assemblierte (Abb. 3-7 C; Abb. 3-8 C). Die an den mitochondrialen Assemblierungspunkten von Dnm1<sup>G185S</sup> beobachtete Unterbrechung der Fluoreszenzsignale von Dendra2 in der mitochondrialen Matrix ist vermutlich auf eine starke Einschnürung der Mitochondrien durch Dnm1<sup>G185S</sup> zurückzuführen. Für wildtypisches Dnm1 beträgt der Durchmesser des Lumens von kontrahierten Dnm1-Ringen nur ca. 25 nm (Mears *et al.*, 2011).

Dnm1<sup>K41A</sup> (Naylor *et al.*, 2006) ist eine weitere geeignete Dnm1-Variante für die gezielte Untersuchung der Dnm1-Assemblierungspunkte sowie einer möglichen Funktion von Dnm1 bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran. Dnm1<sup>K41A</sup> besitzt keine eigene GTPase-Aktivität und kann dementsprechend nicht zur Teilung der Mitochondrien führen (Naylor *et al.*, 2006). Im Gegensatz zur dominant negativen Variante Dnm1<sup>G312D</sup> (Abb. 3-8 A) fördert Dnm1<sup>K41A</sup> die Aktivität des wildtypischen Dnm1 und treibt dessen Selbstassemblierung voran (Naylor *et al.*, 2006). Bei Anwesenheit von GTP kann Dnm1<sup>K41A</sup> selbstassemblieren und ringförmige Strukturen bilden, deren Durchmesser ( $161 \pm 13$  nm) gegenüber dem Durchmesser wildtypischer Dnm1-Ringe ( $109 \pm 16$  nm) signifikant erhöht ist (Naylor *et al.*, 2006). Darüber hinaus bindet Dnm1<sup>K41A</sup> ausschließlich an Mitochondrien (Naylor *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Eigenschaften sollte Dnm1<sup>K41A</sup> zukünftig für den zuvor beschriebenen Photokonversionsassay verwendet werden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Dnm1 an Einschnürungen der Mitochondrien lokalisiert ist (Bleazard *et al.*, 1999) und Spiralen bildet, welche dem Umfang der Einschnürungen von Mitochondrien entsprechen (Ingelman *et al.*, 2005). *In vitro* besitzen diese Spiralen einen Umfang von ca. 129 nm im entspannten Zustand bzw. ca. 59 nm im verengten Zustand (Mears *et al.*, 2011). Bei der Mehrheit der in Abb. 3-9 abgebildeten Mitochondrien betrug der Durchmesser an der Einschnürung ca. 70 - 110 nm. Dementsprechend könnte es sich bei den elektronenmikroskopisch beschriebenen Einschnürungen der Mitochondrien um Dnm1-Bindestellen handeln. Ohne einen immunoelektronenmikroskopischen Nachweis kann jedoch nicht eindeutig bestimmt werden, ob Dnm1 tatsächlich an den mitochondrialen Einschnürungen lokalisiert ist. Daher könnte es sich beispielsweise bei dem Mitochondrium in Abb. 3-9 J sowohl um ein Teilungs- oder Fusionsintermediat handeln.

Anhand der hier präsentierten Ergebnisse und bereits vorhandener Daten kann vielseitig über eine mögliche Rolle von Dnm1 bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran spekuliert werden. Gemeinsam mit der Teilung der Außenmembran könnte die Teilung der mitochondrialen Innenmembran direkt durch Dnm1 erfolgen. In der teilungsdefizienten *Δfis1*-Mutante kann die Einschnürung der mitochondrialen Matrix und damit eventuell auch die Teilung der mitochondrialen Innenmembran erfolgen, während die Teilung der mitochondrialen Außenmembran ausbleibt (Jakobs *et al.*, 2003a). Dementsprechend existieren vermutlich zwei unterschiedliche Maschinerien für die Teilung der mitochondrialen Innen- bzw. Außenmembran. Die Einschnürung der Matrix wurde mittels Photokonversionsassay ausschließlich an Assemblierungspunkten von Dnm1 beobachtet.

Dementsprechend könnte die Teilung der mitochondrialen Innenmembran koordiniert zur Teilung der Außenmembran an den Dnm1-Bindestellen stattfinden.

Auf welche Weise die Teilung der Innenmembran erfolgt, kann bisher nur spekuliert werden. Die Beobachtung von gegenüberliegenden Cristae in unmittelbarer Nähe einer möglichen Dnm1-Bindestelle könnte darauf hindeuten, dass die Teilung der mitochondrialen Innenmembran durch die Fusion zweier dicht beieinanderliegender Cristae verursacht wird. Die Dynamin-verwandte GTPase Mgm1 ist für die Fusion der mitochondrialen Innenmembran notwendig (Wong *et al.*, 2000; Meeusen *et al.*, 2006). Aufgrund seiner Lage im Intermembranraum ist Mgm1, anders als ursprünglich von Wong *et al.* (2000) vorgeschlagen, vermutlich nicht für die Fusion gegenüberliegender Cristae und dementsprechend auch nicht für die Teilung der mitochondrialen Innenmembran verantwortlich. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine bisher unbekannte Maschinerie für die Fusion gegenüberliegender Cristae existiert. Ebenso gut könnte eine eigenständige Teilungsmaschinerie für die mitochondriale Innenmembran existieren. So könnte möglicherweise das Innenmembranprotein Mdm33 eine Rolle bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran spielen (Messerschmitt *et al.*, 2003; bisher unpublizierte Daten von Till Klecker, AG Westermann, Universität Bayreuth). Die Entschlüsselung von Komponenten, welche für die Teilung der mitochondrialen Innenmembran erforderlich sind, kann zukünftig dazu beitragen den Mechanismus der Innenmembranteilung zu verstehen.

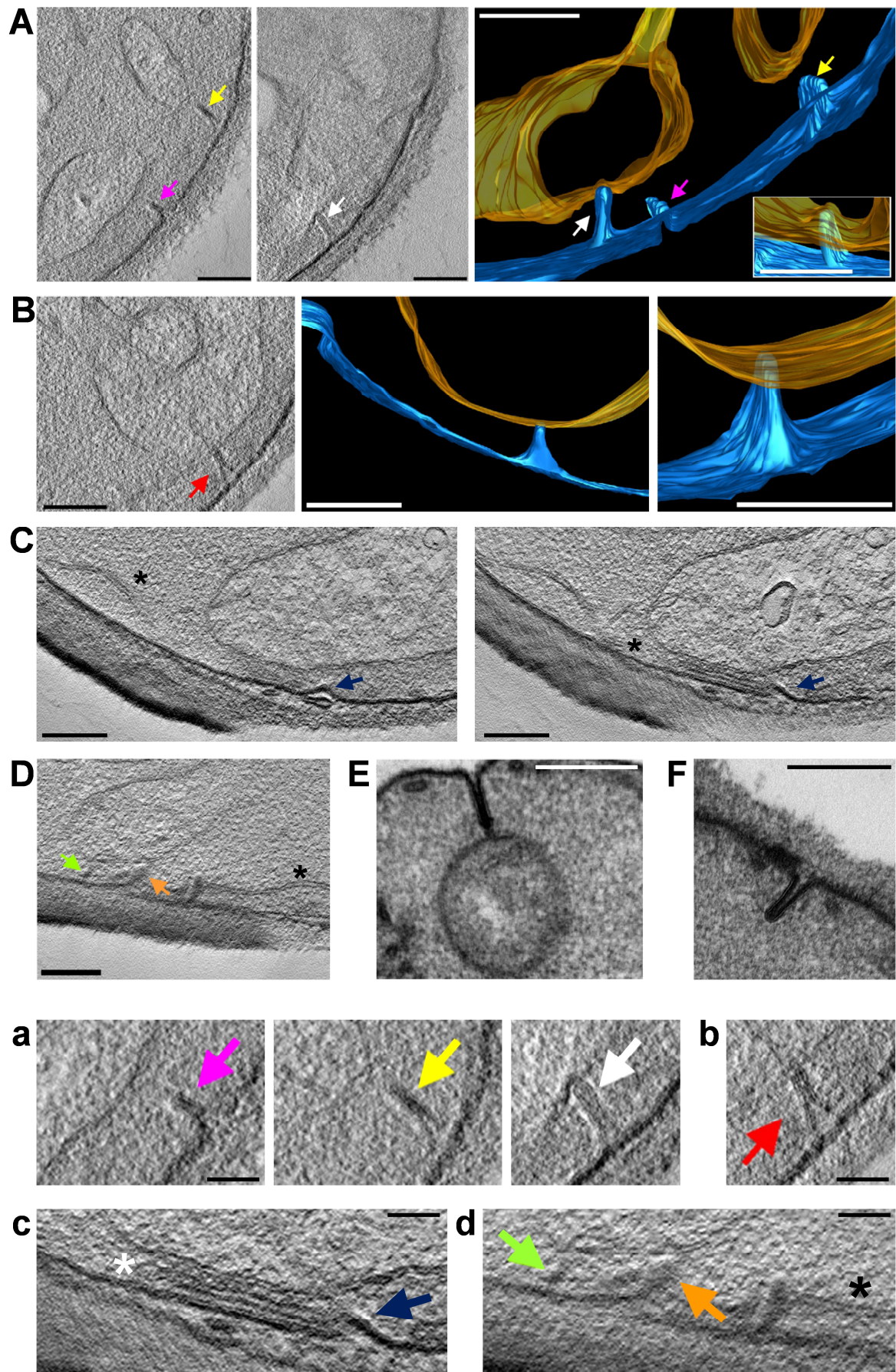
Die hier präsentierten Daten unterstützen eher das Modell, dass die Teilung der mitochondrialen Innenmembran nicht direkt durch Dnm1 erfolgt, aber in Koordination mit den Assemblierungspunkten von Dnm1 stattfindet.

### 3.3. Das kortikale Protein Num1: mitochondriale Dynamik und Zellarchitektur

#### 3.3.1. Ultrastrukturelle Charakterisierung mitochondrialer Verankerungsstellen innerhalb der Retentionszone der Mutterzelle

Da Mitochondrien nicht *de novo* gebildet werden können, müssen sie bei der Zellteilung an die nachfolgende Generation weitervererbt werden. Gleichzeitig muss jedoch der Verbleib einiger Mitochondrien in der Mutterzelle sichergestellt werden. Bei der Verteilung der Mitochondrien in *S. cerevisiae* fungieren die Proteine Num1 und Mmr1 in antagonistischer Weise (Klecker *et al.*, 2013). Während Mmr1 die Mitochondrien der Knospe am kortikalen ER verankert (Swayne *et al.*, 2011), nimmt Num1 eine Schlüsselrolle bei der Verankerung der Mitochondrien in der Mutterzelle ein (Klecker *et al.*, 2013). Bei fluoreszenzmikroskopischen Langzeituntersuchungen lebender Hefezellen konnten mitochondriale Verankerungspunkte am Zellkortex der Mutterzelle beobachtet werden. Diese Verankerungspunkte lagen bei *NUM1*-exprimierenden Zellen in der Region gegenüber der Knospe und fehlten in  $\Delta num1$ -Mutanten vollständig (Klecker *et al.*, 2013). Durch gleichzeitige Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien und Num1 wurde die Lokalisation von Num1 an den mitochondrialen Verankerungspunkten in der Mutterzelle bestätigt (Klecker *et al.*, 2013).

Um diese Verankerungspunkte der Mitochondrien in der Retentionszone der Mutterzellen ultrastrukturell zu charakterisieren, diente die Elektronentomographie als ideale Methode. Für eine eindeutige Identifizierung der Retentionszonen in den Ultradünnschnitten wurden wildtypische Hefezellen verwendet, die mit dem Plasmid pRS426-Myo2-Fis1 transformiert wurden. Myo2-Fis1 ist ein Fusionsprotein, welches aus dem Motorprotein Myo2 und der Membrandomäne von Fis1 besteht und einen charakteristischen mitochondrialen Phänotyp verursacht (Förtsch *et al.*, 2011). In diesen Zellen befindet sich fast die Gesamtheit der Mitochondrien in der Knospe und nur ein oder zwei mitochondriale Tubuli bleiben in der Mutterzelle verankert, sodass sich die Verankerungspunkte leicht identifizieren lassen. Die Mitochondrien in der Retentionszone der Mutterzelle befanden sich häufig in der Nähe von elektronendichtem Material, welches von der Plasmamembran in die Zelle ausstrahlte (Abb. 3-10 A - D; Filme siehe Anhang). In einigen Fällen war eindeutig zu erkennen, dass die Plasmamembran Einstülpungen ausbildete und die Außenmembran der Mitochondrien berührte. Bei zwei der insgesamt fünfzehn elektronentomographisch untersuchten Zellen konnte in der Retentionszone auch das kortikale ER beobachtet werden (Abb. 3-10 C und D).



**Abb. 3-10: Kontaktstellen von Mitochondrien und der Plasmamembran.** (Beschreibung der Abbildung siehe Seite 57.)



**Abb. 3-10: Kontaktstellen von Mitochondrien und der Plasmamembran.** (A) Elektronentomographische Untersuchung einer WT-Hefezelle, die mit dem Plasmid pRS426-Myo2-Fis1 transformiert wurde und Myo2-Fis1 exprimiert. Das linke und mittlere Bild zeigen zwei x/y-Ebenen des selben Tomogramms (Film 6-1 A). Abgebildet ist die Region der Mutterzelle, welche der Knospe gegenüber liegt. Die Pfeile zeigen Invaginationen der Plasmamembran, welche in Richtung der Mitochondrien ragen. Unterschiedliche Membraninvaginationen werden durch verschiedenfarbige Pfeile markiert. Das rechte Bild zeigt die 3D-Rekonstruktion des Tomogramms (Film 6-2). Die Plasmamembran ist in blau, die mitochondriale Außenmembran ist in gelb dargestellt. Der vergrößerte Bildausschnitt zeigt den mit einem weißen Pfeil markierten Mitochondrien-Plasmamembran-Kontakt aus einem anderen Blickwinkel. (B - D) Die Tomogramme dreier anderer Zellen wurden wie in (A) beschrieben angefertigt und sind im Anhang beigelegt (Filme 6-1 B und C; Film 6-3). Die Bilder in (C) zeigen zwei x/y-Ebenen des selben Tomogramms. Die Sternchen markieren das kortikale ER. (E) Elektronenmikroskopische Aufnahme von einem Ultradünnschnitt einer wildtypischen Zelle ohne pRS426-Myo2-Fis1. (F) Elektronenmikroskopische Aufnahme von einem Ultradünnschnitt einer  $\Delta num1$ -Zelle. (a - d) Die Abbildungen sind Ausschnittsvergrößerungen der in (A - D) dargestellten Kontakte zwischen Mitochondrien und Plasmamembran. Die verschiedenfarbigen Pfeile markieren die entsprechenden Membraninvaginationen. Sternchen zeigen das kortikale ER. Sämtliche Aufnahmen sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden und wurden mit Ausnahme von Abbildung (C) für eine Abbildung in Klecker *et al.* (2013) verwendet. Die Größenmaßstäbe entsprechen 250 nm bzw. 100 nm für die Ausschnittsvergrößerungen.

Das kortikale ER war jedoch nur in einem Fall direkt an der Kontaktstelle eines Mitochondriums und der Plasmamembran vorzufinden (Abb. 3-10 C).

Ähnliche Kontakte zwischen Mitochondrien und der Plasmamembran wurden mittels Standardelektronenmikroskopie ebenfalls in WT-Zellen gefunden, die kein Plasmid exprimierten (Abb. 3-10 E). Myo2-Fis1 ist dementsprechend nicht für die Ausbildung der Plasmamembraninvaginationen verantwortlich. Da die Invaginationen der Plasmamembran ebenfalls in  $\Delta num1$ -Zellen zu finden waren (Abb. 3-10 F), hängt die Ausbildung der Membraneinstülpungen auch nicht von Num1 ab. Interessanterweise konnten bei der Deletion von *NUM1* in mehr als einhundert analysierten Zellen keine Mitochondrien gefunden werden, die in Kontakt mit den Invaginationen der Plasmamembran standen. Bei den hier beschriebenen Strukturen handelt es sich möglicherweise um die Verankerungsstellen der Mitochondrien am Zellkortex. Dementsprechend erfolgt die Befestigung der Mitochondrien in der Mutterzelle vermutlich über die Kontakte mit der Plasmamembran.

Num1 übernimmt eine Schlüsselfunktion bei der Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex in *S. cerevisiae* (Klecker *et al.*, 2013). Das Protein verfügt über eine N-terminale Coiled-Coil-Domäne, ein mögliches EF-Hand-Motiv für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ , einen repetitiven Mittelteil und eine C-terminale PH-Domäne, die spezifisch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat erkennt (Kormanec *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 2004). Die N-terminale Domäne von Num1 ist in ihrer Struktur und Funktion sehr ähnlich zu BAR-Domänen (Bin/Amphiphysin/Rvs) (Tang *et al.*, 2012). BAR-Domänen fungieren als Sensoren für die Krümmung von Membranen (Peter *et al.*, 2004). In Mutanten mit einer um die Coiled-Coil-Domäne verkürzten Variante von Num1 ging die Verankerung der Mitochondrien am

Zellkortex verloren. Die verkürzte Num1-Variante blieb am Zellkortex assoziiert, wohingegen sich das Verteilungsmuster dieses Proteins änderte. Der mitochondriale Phänotyp dieser Mutanten ähnelte der mitochondrialen Morphologie in  $\Delta num1$ -Mutanten (Tang *et al.*, 2012; Lackner *et al.*, 2013). Ein ähnlicher mitochondrialer Phänotyp konnte auch in Mutanten mit einer um die PH-Domäne verkürzten Form von Num1 beobachtet werden. Diese Variante von Num1 blieb an den Mitochondrien assoziiert und verlor den Kontakt zum Zellkortex (Tang *et al.*, 2009; Lackner *et al.*, 2013). Aufgrund der Domänenstruktur von Num1 ist der folgende Mechanismus für die Verankerung der Mitochondrien am Zellkortex der Mutterzelle denkbar. Die BAR-ähnliche Domäne von Num1 könnte zur Erkennung der stark gekrümmten Membraninvaginationen der Plasmamembran (Abb. 3-10) dienen und somit, wie von Tang *et al.* (2012) vorgeschlagen, die Position der Assemblierung von Num1 am Zellkortex bestimmen. An diesen Assemblierungspunkten könnten Num1-Moleküle, welche mittels ihrer PH-Domäne stabil mit der Plasmamembran verbunden sind, einen direkten Kontakt zu einem bisher unbekannten Rezeptor auf der Mitochondrienoberfläche herstellen.

In einer aktuellen Studie konnte anhand von Proteomanalysen und *Yeast two-hybrid*-Experimenten gezeigt werden, dass das mitochondrial assoziierte Protein Mdm36 an der durch Num1 vermittelten Verankerung der Mitochondrien beteiligt ist (Lackner *et al.*, 2013). Mdm36 war in unmittelbarer Umgebung von Num1 lokalisiert (Lackner *et al.*, 2013) und die Deletion von *MDM36* bzw. *NUM1* resultiert in einem ähnlichen mitochondrialen Phänotyp (Hammermeister *et al.*, 2010). Der mitochondriale Teilungsdefekt in  $\Delta num1$ - und  $\Delta mdm36$ -Mutanten wird durch den Verlust der mitochondrialen Verankerungspunkte am Zellkortex verursacht und kann durch artifizielle Membrananker wieder gerettet werden (Klecker *et al.*, 2013). Basierend auf diesen Ergebnissen könnte es sich bei Mdm36 um ein Adapterprotein handeln, welches spezifisch die Verankerung der Mitochondrien am kortikalen Num1 vermittelt. An diesem Prozess sind außer Mdm36 höchstwahrscheinlich noch weitere Faktoren beteiligt, da die Kontakte zwischen Num1 und den Mitochondrien auch in  $\Delta mdm36$ -Mutanten beobachtet werden konnten (Lackner *et al.*, 2013). Da in lichtmikroskopischen Untersuchungen das Endoplasmatische Retikulum in der Nähe der Num1-vermittelten Verankerungspunkte von Mitochondrien zu sehen war und ER-assoziierte Proteine durch Bindung an Num1 präzipitiert werden konnten, wurde eine aktive Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums bei der mitochondrialen Verankerung am Zellkortex angenommen (Lackner *et al.*, 2013). In den in der vorliegenden Arbeit angefertigten Tomogrammen war das ER jedoch nur selten in der Retentionszone der Mitochondrien zu finden (Abb. 3-10 C und D; Filme siehe Anhang). Ein direkter Kontakt des kortikalen ER zu

den Mitochondrien oder der Plasmamembran konnte nur ein einziges Mal in der mitochondrialen Retentionszone beobachtet werden (Abb. 3-10 C; Film 6-3). Dies spricht jedoch nicht unmittelbar für eine direkte Beteiligung des ER an der Verankerung der Mitochondrien. In wildtypischen Hefezellen sind ca. 40% der Plasmamembran auf der zytosolischen Seite mit dem kortikalen ER assoziiert (Friedman und Voeltz, 2011, Manford *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012) und von Kontakten zwischen Mitochondrien und dem ER wurde bereits im Zusammenhang mit der mitochondrialen Teilung (Friedman *et al.*, 2011), der Mitophagie (Böckler und Westermann, 2014) und weiteren physiologischen Prozessen (Kornmann und Walter, 2010) berichtet. Die Aufklärung der exakten Rolle des kortikalen ER bei der Verankerung der Mitochondrien und die Identifizierung mitochondrialer Proteine, welche mit Num1 interagieren, bleiben Herausforderungen für zukünftige Experimente. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Tomogramme sprechen eher gegen eine Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums an der mitochondrialen Verankerung. Die hier beschriebene Bindung der Mitochondrien an die Invaginationen der Plasmamembran passt hingegen gut zur Bindung von BAR-Domänen an gekrümmte Membranen.

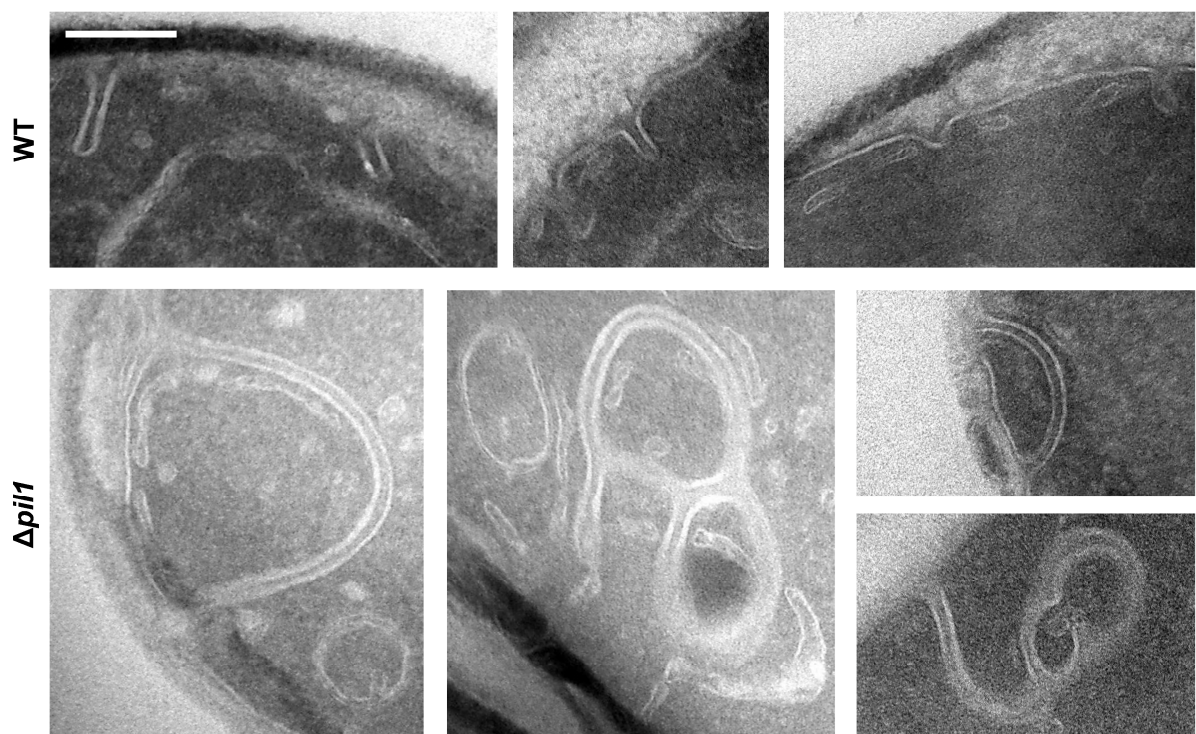
Die Kontakte der Mitochondrien zur Plasmamembran sind ein bestimmender Faktor für die mitochondriale Morphologie und Dynamik in Hefe. In höheren Eukaryoten sind keine homologen Proteine zu Num1 oder Mdm36 bekannt. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob ähnliche Mechanismen für die Verankerung der Mitochondrien in anderen eukaryotischen Zellen existieren.

### **3.3.2. Untersuchung zur Beteiligung von Eisosomen an der Verankerung von Mitochondrien**

Die in dieser Arbeit durch Elektronentomographie beschriebenen Membraninvaginationen in der Retentionszone der Mutterzelle (Abb. 3-10) besitzen eine große Ähnlichkeit zu den zuvor in Hefe beschriebenen furchenartigen Einstülpungen der Plasmamembran (Stradalova *et al.*, 2009), welche durch die Eisosomen (Walther *et al.*, 2006) gebildet werden. Eisosomen sind große, unbewegliche Komplexe, die peripher an der Plasmamembran assoziiert sind (Walther *et al.*, 2006) und eine Rolle im Sphingolipid-Signalweg spielen (Fröhlich *et al.*, 2009). Die ursprünglich vermutete Funktion der Eisosomen, an der Endozytose beteiligt zu sein (Walther *et al.*, 2006), wurde ausgeschlossen (Grossmann *et al.*, 2008; Brach *et al.*, 2011). Die beiden Hauptkomponenten der Eisosomen, Pil1 und Lsp1, verfügen über BAR-Domänen (Olivera-Couto *et al.*, 2011), welche die Krümmung der Membran bewirken. Die durch Eisosomen

gebildeten Membraninvaginationen sind ca. 300 nm lang und 50 nm tief (Stradalova *et al.*, 2009) und überlappen nicht mit dem kortikalen ER (Stradalova *et al.*, 2012). Ausführliche Informationen über die Eisosomen wurden von Douglas *et al.* (2011) zusammengefasst.

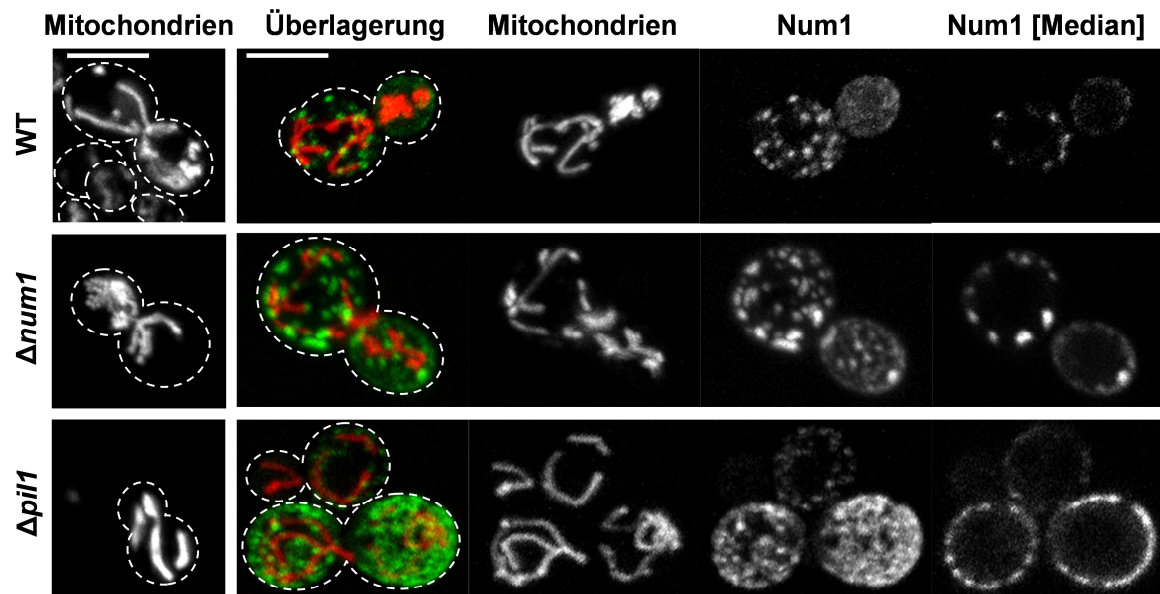
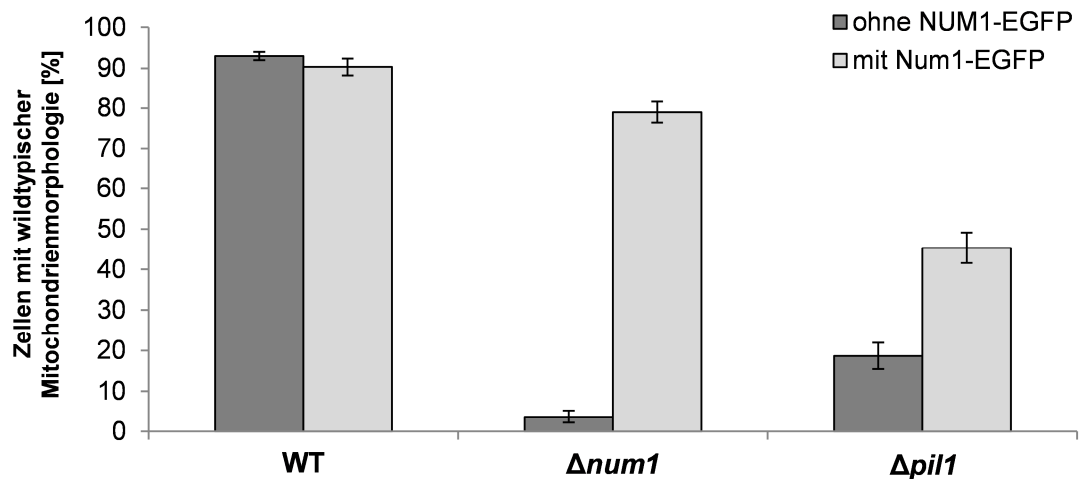
Um herauszufinden, ob es sich bei den Membraneinstülpungen der Num1-vermittelten Mitochondrienverankerung am Zellkortex und den eisosomalen Membraneinstülpungen um dieselben Strukturen handelt, wurden zunächst die Membraneinstülpungen in WT- und  $\Delta pil1$ -Zellen genauer untersucht. Hierfür wurden WT- und  $\Delta pil1$ -Zellen bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium kultiviert, nach einem hefespezifischen Protokoll (Griffith *et al.*, 2008) der Tokuyasu-Methode eingebettet und elektronenmikroskopisch analysiert. Anhand der elektronenmikroskopischen Untersuchung von WT- und  $\Delta pil1$ -Zellen konnte gezeigt werden, dass die Membraneinstülpungen bei der Deletion von *PIL1* sehr viel länger als im WT sind und sich blasenartig in das Zytosol erstrecken (Abb. 3-11). Dementsprechend ist Pil1 an der Regulation der Länge von den Membraneinstülpungen beteiligt. Von einer derartigen Membranomorphologie wurde bereits vereinzelt im Zusammenhang mit verschiedenen Eisosomenkomponenten berichtet (Walther *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2012).



**Abb. 3-11: Das Eisosomenprotein Pil1 bestimmt die Morphologie von Membraneinstülpungen der Plasmamembran.** Dargestellt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Membraninvaginationen in WT- und  $\Delta pil1$ -Zellen. Die Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD-Medium angezogen, nach dem hefespezifischen Protokoll (Griffith *et al.*, 2008) der Tokuyasu-Methode eingebettet und anschließend elektronenmikroskopisch untersucht. Die Membranen erscheinen aufgrund der Negativfärbung weiß. Der Größenmaßstab entspricht 200 nm.

Um herauszufinden, ob sich die veränderte Morphologie der Membraninvaginationen in *Δpil1*-Zellen (Abb. 3-11) auf die Num1-vermittelte Verankerung der Mitochondrien und somit auch auf die mitochondriale Morphologie auswirkt, wurde die mitochondriale Morphologie in WT-, *Δnum1*- und *Δpil1*-Zellen untersucht. Hierfür wurden die entsprechenden Zellen mit dem mitochondrialen Reporterplasmid pVT100U-mtRFP (Mark Dürr, AG Westermann, Universität Bayreuth) transformiert, bis zur logarithmischen Wachstumsphase in glukosehaltigem Minimalmedium kultiviert und anschließend am konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 3-12). Während in fast allen WT-Zellen erwartungsgemäß ein verzweigtes Netzwerk von tubulären Mitochondrien beobachtet werden konnte, verfügten die *Δnum1*-Zellen typischerweise über ein vollständig verbundenes Mitochondrium, welches teilweise aggregiert oder netzartig verzweigt war und nicht mehr in der Mutterzelle verankert wurde (Abb. 3-12 A). Die mitochondriale Morphologie in *Δpil1*-Zellen war nicht wildtypisch und unterschied sich ebenfalls von der mitochondrialen Morphologie in der *Δnum1*-Mutante (Abb. 3-12 A). In der *Δpil1*-Mutante waren häufig nur bis zu drei Mitochondrien mit einer komma- bzw. semikolonartigen Form zu beobachten. Demzufolge führt die Deletion von *PIL1* zu einer Veränderung der mitochondrialen Morphologie, welche sich jedoch von der Morphologie der Mitochondrien in *Δnum1*-Zellen unterscheidet. Diese verschiedenen mitochondrialen Phänotypen deuten darauf hin, dass Pil1 und Num1 die mitochondriale Morphologie auf unterschiedliche Weise beeinflussen.

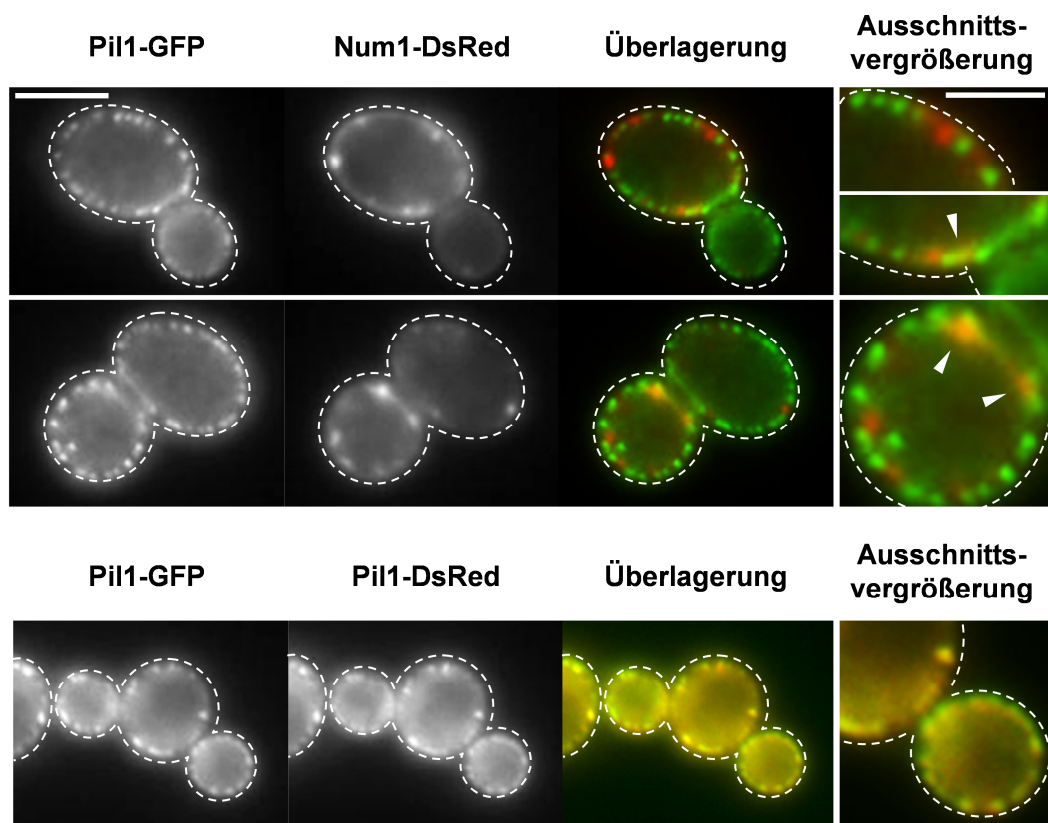
Für die Beantwortung der Frage, ob die veränderte Morphologie der Membraneinstülpungen in *Δpil1*-Zellen die Lokalisation von Num1 beeinflusst und dadurch der veränderte mitochondriale Phänotyp in *Δpil1*-Zellen verursacht wird, wurden Zellen der bereits verwendeten Stämme zusätzlich mit pAG415GPD-Num1-EGFP transformiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Durch die Expression von Num1-EGFP konnte der mitochondriale Phänotyp der *Δnum1*-Mutante fast vollständig gerettet werden (Abb. 3-12 A und B). Die Fluoreszenzsignale von Num1-EGFP waren in allen Stämmen gleichmäßig am Zellkortex verteilt. Interessanterweise führte die Überexpression von *NUM1-EGFP* unter Kontrolle des *GPD*-Promotors auch teilweise zur Rettung des mitochondrialen Phänotyps bei einigen *Δpil1*-Zellen (Abb. 3-12 A und B). Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die veränderte Morphologie der Membraninvaginationen in der *Δpil1*-Mutante keinen Einfluss auf die Lokalisation von Num1-EGFP hatte. Die veränderte mitochondriale Morphologie der *Δpil1*-Mutante kann jedoch durch die Überexpression von Num1-EGFP beeinflusst werden.

**A****B**

**Abb. 3-12: Beeinflussung der mitochondrialen Morphologie durch Num1 und das Eisosomenprotein Pil1. (A)** Die linken Bilder zeigen die mitochondrialen Phänotypen von logarithmisch gewachsenen WT-,  $\Delta num1$ - und  $\Delta pil1$ -Zellen, die mit Hilfe von pVT100U-mtRFP einen rot fluoreszierenden Mitochondrienmarker (mtRFP) exprimierten und am konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden. Die Aufnahmen sind Projektionen der maximalen Intensität des roten Fluoreszenzsignals aus einem z-Stapel mit 20 Ebenen. Die rechte Bildtafel zeigt die mitochondriale Morphologie sowie die kortikale Verteilung von Num1-EGFP in WT-,  $\Delta num1$ - und  $\Delta pil1$ -Zellen. Die logarithmisch gewachsenen Zellen verfügten über pAG415GPD-Num1-EGFP und pVT100U-mtRFP und wurden wie zuvor beschrieben untersucht. Die Aufnahmen sind Projektionen der maximalen Intensität von überlagerten, roten (Mitochondrien) und grünen (Num1) Fluoreszenzsignalen aus einem z-Stapel mit 20 Ebenen. Das Bild ganz rechts (Num1 [Median]) zeigt die Fluoreszenzverteilung von Num1 in einer mittleren Fokusebene. Die Strichlinien zeigen die Konturen der Zellen. Der Größenmaßstab entspricht 5  $\mu m$ . **(B)** Die Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie erfolgte in drei unabhängigen Experimenten anhand der in (A) beschriebenen Zellen ohne bzw. mit der Expression von Num1-EGFP. Bei jedem der drei Experimente wurden von jedem Stamm jeweils 100 Zellen ausgezählt. Dargestellt ist der Anteil der Zellen, welche über eine wildtypische Mitochondrienmorphologie verfügten. Die Balken zeigen den Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils 100 ausgezählten Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei durchgeführten Experimente.



Das kortikale Verteilungsmuster von Num1 (Abb. 3-12) ähnelte sehr stark der punktförmigen Verteilung von Pil1 und anderen Eisosomenkomponenten am Zellkortex (Walther *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2012). Bei Proteomanalysen wurden Pil1 und vier weitere Eisosomenkomponenten identifiziert, die gemeinsam mit Num1 interagierten (Lackner *et al.*, 2013). Um zu überprüfen, ob Num1 und Pil1 am Zellkortex kolokalisieren, wurde ein *PIL1-GFP* exprimierender WT-Stamm (Huh *et al.*, 2003) mit pAG415GPD-Num1-DsRed oder pAG415GPD-Pil1-DsRed transformiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Während Pil1-GFP und Pil1-DsRed vollständig kolokalisierten, konnte keine gemeinsame Lokalisation von Pil1 und Num1 beobachtet werden (Abb. 3-13). Num1 und Pil1 sind am Zellkortex räumlich voneinander getrennt.



**Abb. 3-13: Num1 und das Eisosomenprotein Pil1 sind nicht gemeinsam am Zellkortex lokalisiert.** Zellen des wildtypischen Hefestammes BY4741, welche ein genomisch codiertes Pil1-GFP (Huh *et al.*, 2003) exprimierten, wurden mit einem Plasmid transformiert, das entweder für Num1-DsRed oder Pil1-DsRed codierte. Die Untersuchung zur Kolokalisation erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop. Die Aufnahmen zeigen die kortikale Verteilung von Num1 und Pil1 in einer mittleren Zellebene. Weiße Pfeile markieren Stellen, an denen Num1 und Pil1 sehr dicht nebeneinander vorkommen aber nicht kolokalisieren. Die Konturen der Zellen sind durch Strichlinien dargestellt. Die Größenmaßstab entspricht 5  $\mu\text{m}$  bzw. 2,5  $\mu\text{m}$  für die Ausschnittsvergrößerungen.

Aufgrund der Interaktion von Num1 mit Pil1 und anderen Eisosomenkomponenten (Lackner *et al.*, 2013) sowie der Beobachtung von morphologisch ähnlichen Membraneinstülpungen bei der Num1-vermittelten Mitochondrienverankerung (Abb. 3-10 A-D, Klecker *et al.*, 2013) und bei Eisosomen (Stradalova *et al.*, 2009) wurde zunächst angenommen, dass Num1 gemeinsam mit Pil1 und anderen Eisosomenkomponenten an den Membraneinstülpungen am Zellkortex lokalisiert sein könnten. Jedoch konnte fluoreszenzmikroskopisch keine gemeinsame Lokalisation von Num1 und Pil1 am Zellkortex beobachtet werden (Abb. 3-13). Dementsprechend könnte es sich bei den beschriebenen Membraneinstülpungen einerseits um funktionell verschiedene Kompartimente handeln, andererseits wäre auch eine zeitliche Abfolge der Proteinbindung an identischen Membraneinstülpungen denkbar. In diesem Fall könnte zunächst die Bildung einer Membraninvagination durch die Eisosomen erfolgen um anschließend für die Num1-vermittelte Mitochondrienverankerung am Zellkortex zu dienen. Ein derartiges Modell könnte durch zeitaufgelöste Elektronentomografie getestet werden. Diese korrelative Mikroskopiemethode diente bereits erfolgreich dazu, die zeitliche und räumliche Abstimmung der komplexen Proteinmaschinerie während der Membranumformung bei der Endozytose aufzuklären (Kukulski *et al.*, 2012).

Um herauszufinden, ob sich Num1 tatsächlich an den Invaginationen der Plasmamembran befindet, wurde die Lokalisation von Num1 am Zellkortex immuno-elektronenmikroskopisch untersucht. Hierfür wurde *NUM1* mit einem 3xHA-Marker versehen und unter Kontrolle verschiedener Promotoren in wildtypischen Zellen exprimiert. Bei der Expression von *NUM1*-3xHA unter Kontrolle des endogenen Promotors bzw. des *GPD*-Promotors konnte bisher jedoch keine spezifische Immunogoldmarkierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch durch die Überexpression von *NUM1*-GFP unter Kontrolle des *MET25*-Promotors wurden keine eindeutigen Signale bei der Lokalisierung von Num1 festgestellt (persönliche Kommunikation mit Prof. Fulvio Reggiori, UMC Utrecht). Die vergleichsweise geringe Anzahl an Num1-Molekülen innerhalb der Zelle (Ghaemmaghami *et al.*, 2003) könnte eine mögliche Ursache für die schlechte Detektierbarkeit von Num1 in immuno-elektronenmikroskopischen Untersuchungen darstellen. Jedoch konnte auch die Überexpression von markiertem *NUM1* unter der Kontrolle des *GPD*- bzw. *MET25*-Promotors nicht dazu beitragen, Num1 am Zellkortex zu lokalisieren. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass die mitochondrialen Verankerungspunkte unter normalen Bedingungen in wildtypischen Zellen elektronenmikroskopisch schwer zu identifizieren sind. Um die immuno-elektronenmikroskopische Lokalisierung von Num1 zu



erleichtern, könnte erneut die Expression von Myo2-Fis1 (Abschnitt 3.3.1.) zur besseren Identifizierung der mitochondrialen Verankerungspunkte verwendet werden.

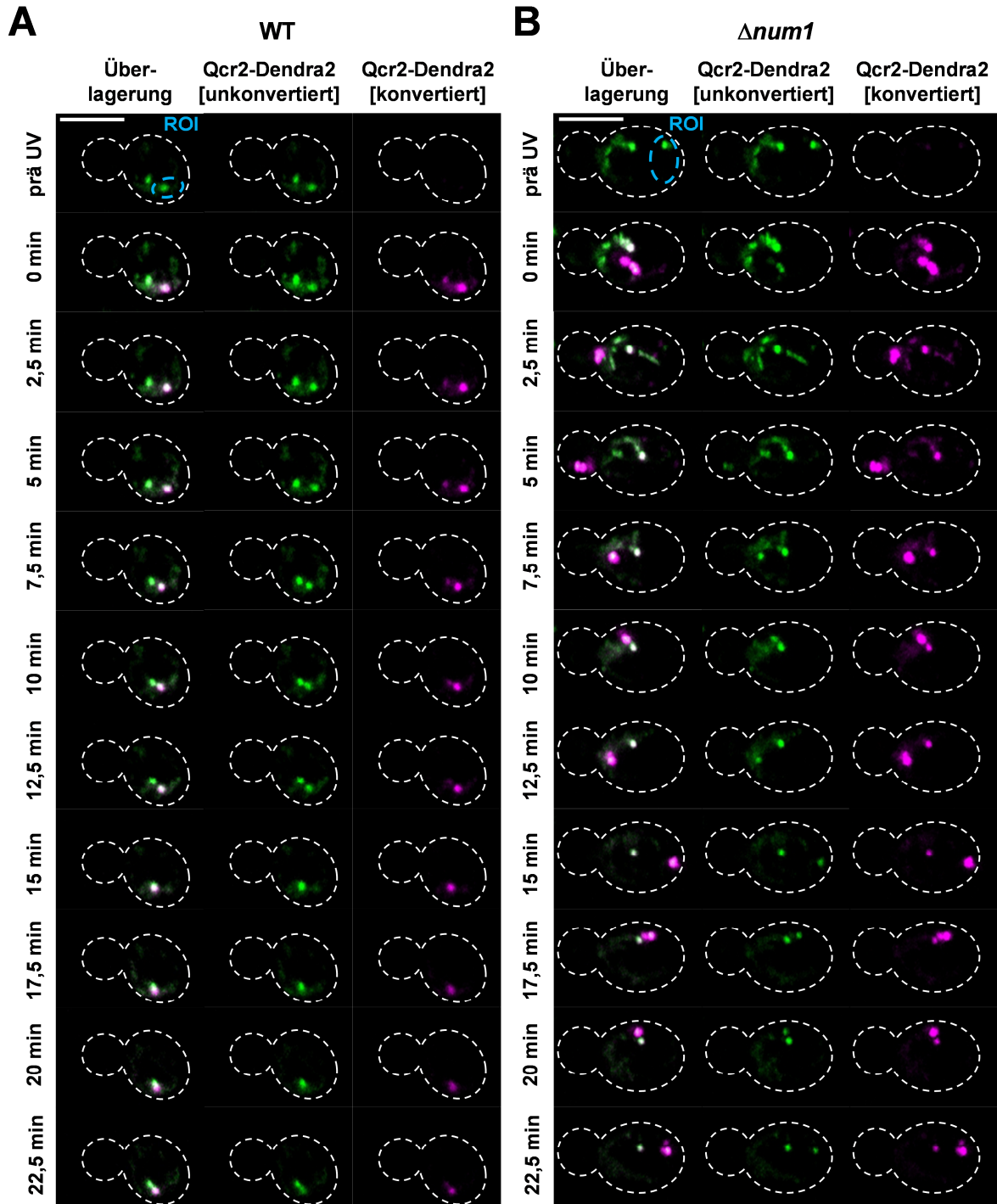
Die genaue Lokalisation von Num1 am Zellkortex und die weitere Untersuchung des möglichen Zusammenhangs zwischen Eisosomen und der Num1-vermittelten Verankerung von Mitochondrien bleiben wichtige Aufgaben, die es in der Zukunft zu lösen gilt.

### **3.3.3. Bestimmung der biologischen Funktion der durch Num1 vermittelten**

#### **Verankerung von Mitochondrien**

Num1 ist in *S. cerevisiae* eine Schlüsselkomponente bei der mitochondrialen Verankerung am Zellkortex der Mutterzelle (Kleckner *et al.*, 2013; Lackner *et al.*, 2013). Die molekularen Mechanismen für die mitochondriale Verankerung und die damit verbundenen Funktionen für die Vererbung der Mitochondrien sind bisher weitestgehend unverstanden. Durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie wurde gezeigt, dass die Num1-vermittelte Verankerung von Mitochondrien für eine gleichmäßige Verteilung der Mitochondrien zwischen Mutter- und Tochterzellen wichtig ist (Kleckner *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang könnte die mitochondriale Verankerung auch dazu beitragen, die Verteilung der mtDNA zu regulieren und die gezielte Vererbung funktioneller Mitochondrien zu gewährleisten. Für die Überprüfung dieser Hypothese stellt der zuvor beschriebene Photokonversionsassay eine geeignete Methode dar.

Um die Photokonversion von Dendra2 auch für Langzeituntersuchungen zur Verteilung individueller Mitochondrien oder Nukleoide nutzen zu können, musste zunächst Dendra2 in seiner freien Bewegung möglichst eingeschränkt werden. In Säugerzellen wurde bereits beobachtet, dass die Atmungskettenkomplexe aufgrund ihrer eingeschränkten Diffusion auch in dynamischen Mitochondrien nur begrenzt zwischen verschiedenen Cristae ausgetauscht werden (Wilkens *et al.*, 2012). Basierend auf dieser Beobachtung wurde Qcr2, eine Untereinheit des Atmungskettenkomplexes III, C-terminal mit Dendra2 markiert und im Photokonversionsassay verwendet. Hierfür wurden WT- und  $\Delta num1$ -Zellen, welche das Plasmid pYX142-Qcr2-Dendra2 exprimierten, zunächst in glukosehaltigem Minimalmedium angezogen, anschließend für mindestens sechs Stunden in YPG-Medium kultiviert und am konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der Photokonversionsassay erfolgte wie zuvor beschrieben (Abschnitt 3.1.2.). Während in den wildtypischen Zellen die Signale von Qcr2-Dendra2 fast über den gesamten Beobachtungszeitraum statisch an der gleichen Stelle blieben (Abb. 3-14 A), war in der  $\Delta num1$ -Mutante eine starke Bewegung von Qcr2-Dendra2 zu



**Abb. 3-14: Zelluläre Bewegung von Qcr2 in WT- und  $\Delta num1$ -Zellen.** WT- und  $\Delta num1$ -Zellen, welche pXY142-Qcr2-Dendra2 exprimierten, wurden zunächst in glukosehaltigem Minimalmedium angezogen und anschließend für mindestens sechs Stunden in YPG-Medium kultiviert. Die Photokonversion von Qcr2-Dendra2 erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Ablauf (Abschnitt 3.1.2.). präUV, initialer z-Stapel vor der Photokonversion; ROI, Region in welcher die Photokonversion durchgeführt wurde. (**A**, **B**) Die Abbildung zeigt die Bewegung von Qcr2-Dendra2 in WT- (**A**) und  $\Delta num1$ -Zellen (**B**). Die Bilder sind Projektionen der maximalen Intensität von überlagerten, grünen (unkonvertiert) und roten (konvertiert) Fluoreszenzsignalen aus z-Stapeln mit 10 Ebenen. Die z-Stapel wurden nach der Photokonversion in Abständen von 2,5 min aufgenommen. Die Konturen der Zellen sind durch Strichlinien dargestellt. Die Maßstäbe entsprechen 5  $\mu m$ .

beobachten (Abb. 3-14 B). Diese verstärkte Bewegung resultiert vermutlich von der fehlenden Verankerung der Mitochondrien in  $\Delta num1$ -Zellen. Durch die Markierung von Qcr2 mit Dendra2 konnten unkonvertierte und konvertierte Fluoreszenzsignale stabil über einen langen Beobachtungszeitraum verfolgt werden, ohne dass es zu einem Austausch des Fluoreszenzmarkers und somit zu einer Vermischung der verschiedenen Signale kam. Anhand dieser Beobachtungen kann geschlossen werden, dass Qcr2 als Komponente der Atmungskette bei der Bewegung innerhalb der mitochondrialen Innenmembran sehr stark eingeschränkt ist. Durch die Fluoreszenzmarkierung von langsam diffundierenden Proteinen, hier am Beispiel von Qcr2 gezeigt, lässt sich der Photokonversionsassay sehr gut für Langzeituntersuchungen verwenden.

Aufbauend auf diesem initialen Experiment könnten die nachfolgend beschriebenen Experimente zur Untersuchung der Vererbung individueller Mitochondrien oder spezifischer Nukleotide durchgeführt werden. Da bei der Markierung von Qcr2 mit Dendra2 nicht das komplette mitochondriale Netzwerk markiert ist, kann nach dem bisherigen Versuchsaufbau nicht genau bestimmt werden, ob die Mitochondrien zusammenhängend oder getrennt vorliegen. Um bei diesem Experiment gleichzeitig die Bewegung des gesamten mitochondrialen Netzwerkes zu beobachten, bedarf es eines weiteren Fluoreszenzmarkers, der die Mitochondrien markiert und sich in seiner Farbe von dem unkonvertierten grünen bzw. dem konvertierten roten Fluoreszenzsignal von Dendra2 unterscheidet. Hierfür könnte man das Plasmid pAG416GPD-ccdB-E2-Crimson (Abb. 3-4) auf Grundlage der Gateway-Technologie mit einer mitochondrialen Zielsequenz versehen und auf diese Weise die mitochondriale Matrix mit dem im tiefroten Spektrum fluoreszierenden E2-Crimson (Strack *et al.*, 2009) markieren. Eine vielversprechende Alternative zur Markierung von Qcr2 mit Dendra2, bei welcher das mitochondriale Netzwerk durch einen zusätzlichen Fluoreszenzmarker (z. B. E2-Crimson) markiert werden müsste, könnte die Fluoreszenzmarkierung der ATP-Synthase-Untereinheit Atp3 mit Dendra2 darstellen. In ersten Vorversuchen, bei welchen das *ATP3* im Hefegenom mit einem 3x*Dendra2*-Marker versehen wurde, konnte durch Expression von Atp3-Dendra2 das gesamte mitochondriale Netzwerk markiert werden (Abb. 3-5). Da Atp3 als Bestandteil der ATP-Synthase in seiner freien Bewegung innerhalb der mitochondrialen Innenmembran ähnlich eingeschränkt ist wie Qcr2, konnten durch die Photokonversion von Atp3-3x*Dendra2* einzelne Bereiche des mitochondrialen Netzwerkes markiert und die Bewegung der markierten Mitochondrien über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, ohne dass es zur Vermischung der unterschiedlichen Dendra2-Signale kam (vorläufige Daten, nicht gezeigt). Dementsprechend

könnte die mitochondriale Vererbung mit Hilfe von Atp3-3xDendra2 im Photokonversionsassay untersucht werden, ohne dass ein weiterer Fluoreszenzmarker zur Markierung des gesamten mitochondrialen Netzwerkes notwendig ist.

In einer aktuellen Studie wurde das mitochondriale Reporterkonstrukt pRS415GPD-mtKillerRed dazu verwendet, Mitochondrien durch die induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zu schädigen (Heo *et al.*, 2013). KillerRed, eine mutierte Variante von RFP, produziert bei Bestrahlung mit grünem Licht reaktive Sauerstoffspezies wie z. B. Singulett-Sauerstoff und Superoxide (Bulina *et al.*, 2006). Mit Hilfe von mtKillerRed in Verbindung mit dem Photokonversionsassay könnte man sowohl die Vererbung von Mitochondrien als auch die Bedeutung der Num1-vermittelten Verankerung bei der mitochondrialen Vererbung untersuchen. Um in diesem Zusammenhang die Verteilung der mtDNA zu verfolgen, könnte das integrale Membranprotein Yme2 mit Dendra2 markiert werden. Yme2 ist in der Innenmembran der Mitochondrien lokalisiert und spielt bei der Erhaltung von Struktur und Anzahl mitochondrialer Nukleotide eine wichtige Rolle (Park *et al.*, 2006). Auf diese Weise könnte man vermutlich die Bewegung individueller Nukleotide für längere Zeit beobachten. Erste Experimente, bei denen für die Markierung der Nukleotide zunächst das DNA-bindende Protein Abf2 mit Dendra2 markiert wurde (Abb. 3-3 C), ermöglichten bereits die spezifische Markierung einzelner Nukleotide durch die Photokonversion von Dendra2. Für weitere Experimente zur Untersuchung der Vererbung mitochondrialer DNA ist Yme2 aufgrund seiner Verankerung in der mitochondrialen Innenmembran möglicherweise besser geeignet als Abf2. Bei der Photokonversion von Abf2-Dendra2 konnte in einem Fall der Austausch von fluoreszenzmarkiertem Abf2 zwischen verschiedenen Nukleoiden beobachtet werden. Um individuelle Nukleotide bei der Untersuchung zur Vererbung der mitochondrialen DNA eindeutig identifizieren zu können, ist es wichtig, dass sich die Signale der spezifisch markierten Nukleotide nicht vermischen können. Durch die Fluoreszenzmarkierung des in der mitochondrialen Innenmembran verankerten Yme2 mit Dendra2 sollte sich ein Austausch von fluoreszenzmarkierten Proteinen zwischen den einzelnen Nukleoiden verhindern lassen.

Die hier beschriebenen Experimente könnten zukünftig dabei helfen, die biologische Funktion der Num1-vermittelten Verankerung von Mitochondrien zu bestimmen und die Prozesse bei der mitochondrialen Vererbung zu verstehen. Durch die Fluoreszenzmarkierung von Qcr2 mit Dendra2 konnte im Photokonversionsassay gezeigt werden, dass Qcr2 bei der Bewegung innerhalb der mitochondrialen Innenmembran sehr stark eingeschränkt ist. Auf Grundlage dieser Beobachtung lässt sich der Photokonversionsassay sehr gut für verschiedene Langzeitexperimente zur Vererbung der Mitochondrien verwenden.

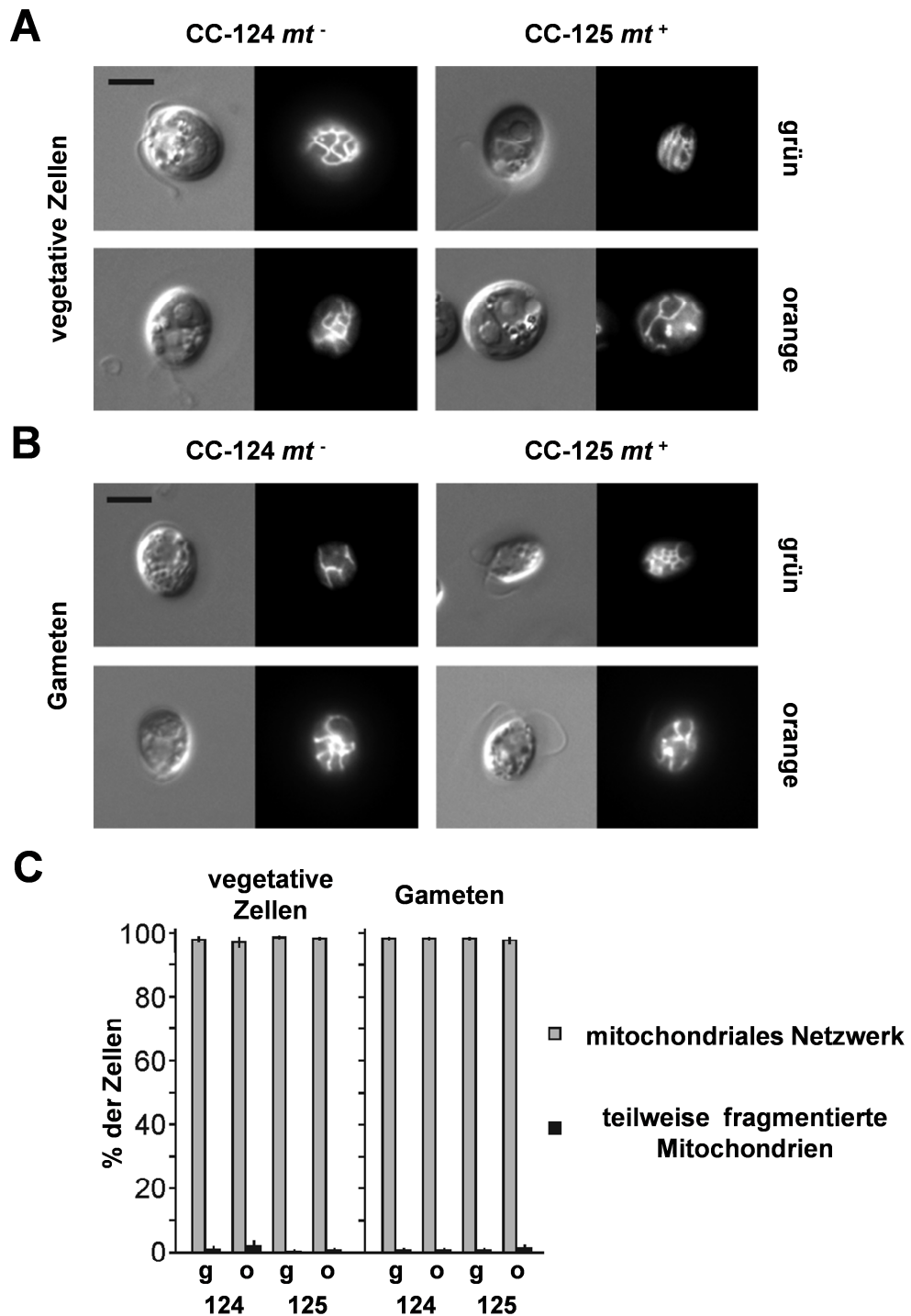
### 3.4. Mitochondriale Fusion in Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii*

#### 3.4.1. Beschreibung der Mitochondrienmorphologie in wildtypischen vegetativen Zellen und Gameten

Während in *S. cerevisiae* und Säugetieren die mitochondriale Dynamik intensiv untersucht und ausführlich beschrieben wurde, ist in Algen und höheren Pflanzen nur sehr wenig über die mitochondriale Dynamik, insbesondere die Fusion von Mitochondrien, bekannt. Für den Nachweis der mitochondrialen Fusion in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (siehe Abschnitt 3.4.2.) wurde ein Versuchsansatz verwendet, der auf der Vermischung von verschiedenfarbigen Fluoreszenzmarkern in Zygoten basiert und bereits erfolgreich in Hefe dazu diente, die mitochondriale Fusion aufzudecken (Nunnari *et al.*, 1997).

Um zunächst die mitochondriale Morphologie in *Chlamydomonas reinhardtii* zu beschreiben, wurden wildtypische vegetative Zellen und Gameten mit den Vitalfluoreszenzfarbstoffen MitoTracker Green und MitoTracker Orange gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die MitoTracker-Farbstoffe sind speziell für die Färbung von Mitochondrien geeignet, da sie selektiv von Mitochondrien aufgenommen werden. In Übereinstimmung mit vorherigen Berichten (Osafune *et al.*, 1972; Grobe und Arnold, 1975; Morris *et al.*, 1985; Ehara *et al.*, 1995) erschienen die Mitochondrien in den vegetativen Zellen (Abb. 3-15 A) und Gameten (Abb. 3-15 B) typischerweise als lange, verzweigte Tubuli. Dieser Phänotyp wurde in mindestens 98 % der Zellen beobachtet (Abb. 3-15 C) und unterschied sich weder zwischen den beiden Paarungstypen oder bei der Verwendung der zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe.

Dementsprechend sind die Fluoreszenzfarbstoffe MitoTracker Green und MitoTracker Orange ideal für die Markierung der Mitochondrien in *C. reinhardtii* verwendbar und optimal für die Untersuchung der mitochondrialen Fusion geeignet.



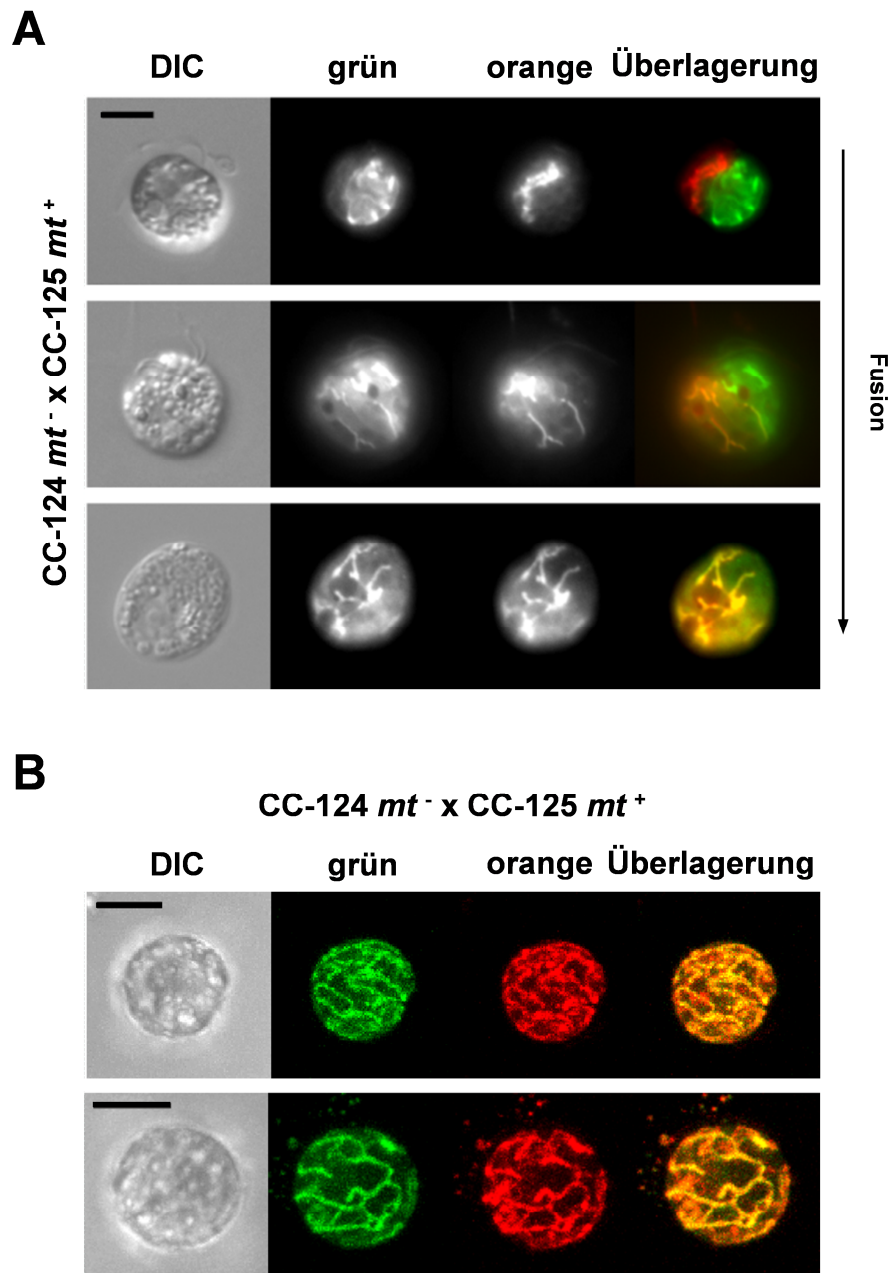
**Abb. 3-15: Mitochondriale Morphologie in vegetativen Zellen und Gameten wildtypischer *C. reinhardtii*-Stämme (Scholz und Westermann, 2013).** (A) Vegetative Zellen der Wildtypstämme CC-124 *mt*<sup>-</sup> und CC-125 *mt*<sup>+</sup> wurden nach vier- bis sechstägiger Inkubation in Flüssigmedium während der Lichtperiode geerntet und die Mitochondrien mit den Farbstoffen MitoTracker Green oder MitoTracker Orange gefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Links, differentieller Interferenzkontrast; rechts, Fluoreszenzmikroskopie. Der Maßstab entspricht 5 µm. (B) Die Gametogenese wurde durch den Transfer der Zellen in stickstoffreies Medium und die anschließende Inkubation bei kontinuierlicher Beleuchtung für 15 h induziert. Die Untersuchung der mitochondrialen Morphologie von Gameten erfolgte wie zuvor beschrieben. Links, differentieller Interferenzkontrast; rechts, Fluoreszenzmikroskopie. Der Maßstab entspricht 5 µm. (C) Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie in vegetativen Zellen und Gameten. Die Balken zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit je 100 untersuchten Zellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente. g, MitoTracker Grün; o, MitoTracker Orange; 124, CC-124 *mt*<sup>-</sup>; 125, CC-125 *mt*<sup>+</sup>.

### 3.4.2. Fusion der Mitochondrien in Wildtypzygoten

Ein Assay zum Nachweis der mitochondrialen Fusion *in vivo* wurde bereits für *S. cerevisiae* entwickelt. In diesem Assay werden die Mitochondrien haploider Hefezellen entgegengesetzten Paarungstyps entweder mit einem in der Mitochondrienmatrix lokalisierten GFP oder einem rot fluoreszierenden Reporterprotein markiert bzw. mit MitoTracker Red angefärbt. Nach der Paarung und der Bildung von Zygoten werden die Mitochondrien fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Durch die Vermischung der grünen und roten Mitochondrienmarker innerhalb der Zygoten wird die Fusion der Mitochondrien gezeigt (Nunnari *et al.*, 1997). Ähnliche *in vivo* Assays basieren ebenfalls auf der Vermischung mitochondrialer Marker und wurden bereits erfolgreich zum Nachweis der mitochondrialen Fusion in Säugerzellen (Legros *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2003; Mattenberger *et al.*, 2003), pflanzlichen Zellkulturen (Sheahan *et al.*, 2005) und in myelinisierten Axonen von Fröschen (Zhang *et al.*, 2012) eingesetzt.

Um der Frage nachzugehen, ob mitochondriale Fusion auch in *Chlamydomonas reinhardtii* stattfindet, wurde in dieser Arbeit nach dem Prinzip des oben beschriebenen Fusionsassays vorgegangen. Zellen von *C. reinhardtii* sind normalerweise haploid und besitzen einen Paarungstyp, welcher entweder als *mt*<sup>+</sup> (maternal) oder *mt*<sup>-</sup> (paternal) bezeichnet wird. Bei Stickstoffmangel entwickeln sich die haploiden vegetativen Zellen zu Gameten, die sich mit Gameten des entgegengesetzten Paarungstyps paaren und Zygoten ausbilden können (Harris, 2001). Wildtypische Gameten der entgegengesetzten Paarungstypen wurden mit MitoTracker Green oder MitoTracker Orange gefärbt, im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend die Zygoten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bereits 15 min nach dem Beginn der Paarung konnte die Durchmischung der mitochondrialen Marker beobachtet werden. Während zu Beginn in einigen Zygoten noch unfusionierte oder teilweise fusionierte Mitochondrien auftauchten, waren die Mitochondrien 60 min nach dem Vermischen der Gameten in fast allen Zygoten vollständig fusioniert (Abb. 3-16 A und Abb. 3-19 B). Die vollständige Fusion von Mitochondrien in Zygoten konnte ebenfalls durch konfokale 3D-Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden (Abb. 3-16 B).

Anhand dieser Beobachtungen kann geschlussfolgert werden, dass Mitochondrien in Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* ohne Weiteres fusionieren.

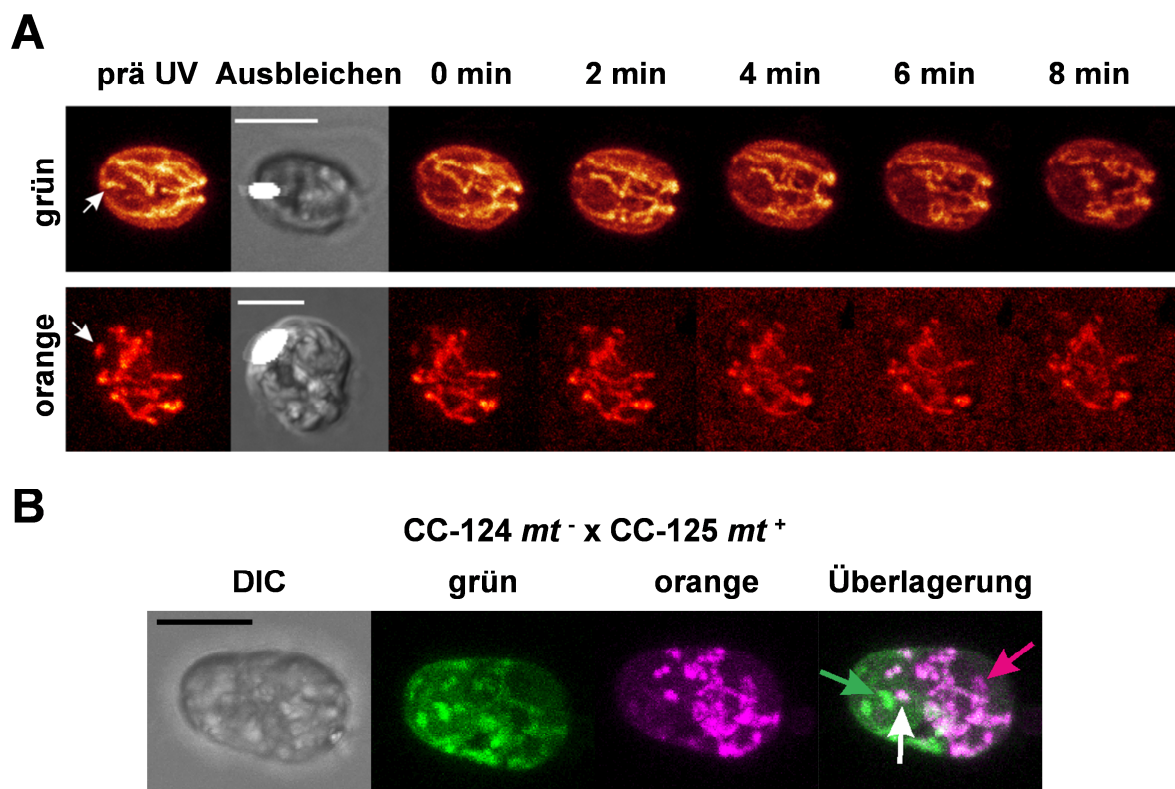


**Abb. 3-16: Mitochondriale Fusion in wildtypischen Zygoten von *C. reinhardtii* (Scholz und Westermann, 2013).** (A) Die Gameten des WT-Stammes CC-124 *mt*<sup>-</sup> wurden mit MitoTracker Green und die Gameten des WT-Stammes CC-125 *mt*<sup>+</sup> wurden mit MitoTracker Orange gefärbt. Anschließend wurden die Gameten miteinander vermischt und bei Licht inkubiert. Die entstandenen Zygoten wurden 5-45 min nach Vermischung der Gameten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abgebildet sind verschiedene, repräsentative Zygoten, deren Mitochondrien entweder nicht fusioniert (oben), teilweise fusioniert (Mitte) oder vollständig fusioniert (unten) waren. DIC, differentieller Interferenzkontrast. Der Maßstab entspricht 5  $\mu$ m. (B) Wildtypische Zygoten wurden wie zuvor beschrieben hergestellt und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Dargestellt sind zwei repräsentative Zygoten mit vollständig fusionierten Mitochondrien. Die Fluoreszenzbilder sind Projektionen der maximalen Intensität mehrerer konfokaler Ebenen. Der Größenmaßstab entspricht 5  $\mu$ m.



Um sicher zu stellen, dass die beobachtete Fusion der Mitochondrien (Abb. 3-16) nicht aufgrund von Diffusion der Fluoreszenzfarbstoffe zwischen den Mitochondrien zustande kommt, wurden FRAP-Experimente an wildtypischen Gameten mit grün oder rot markierten Mitochondrien durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.4. für ein detailliertes Protokoll). Bei den FRAP-Experimenten wurde ein kleiner Bereich des mit MitoTracker-Farbstoff gefärbten mitochondrialen Netzwerkes von wildtypischen Gameten ausgebleicht und die eventuelle Regeneration des Signals im gebleichten Bereich verfolgt (Abb. 3-17 A). Da bei beiden MitoTracker-Farbstoffen eine Regeneration der Fluoreszenzsignale auch 8 min nach dem Ausbleichen der Farbstoffe in einzelnen Mitochondrien ausblieb, konnte die mitochondriale Spezifität der MitoTracker-Farbstoffe belegt werden. Darüber hinaus konnte bei einigen der im Fusionsassay untersuchten Zygoten neben ausschließlich grün oder orange gefärbten Mitochondrien gleichzeitig Mitochondrien beobachtet werden, die über beide Fluoreszenzfarbstoffe verfügten (Abb. 3-17 B). Eine derartige Verteilung von unterschiedlich angefärbten Mitochondrien innerhalb einer Zelle wäre nicht zu erwarten, wenn die mitochondrialen Fluoreszenzfarbstoffe aufgrund von Diffusion durchs Zytosol ausgetauscht werden würden.

Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Doppelfärbung von Mitochondrien aufgrund erfolgreicher mitochondrialer Fusionsereignisse zustande kommt.



**Abb. 3-17: MitoTracker-Farbstoffe werden nicht aufgrund von Diffusion durch das Zytosol zwischen Mitochondrien ausgetauscht.** (Beschreibung der Abbildung siehe Seite 74.)

**Abb. 3-17: MitoTracker-Farbstoffe werden nicht aufgrund von Diffusion durch das Zytosol zwischen Mitochondrien ausgetauscht.** (A) Für die FRAP-Experimente wurden wildtypische Gameten der Stämme CC-124 *mt<sup>-</sup>* (oben) und CC-125 *mt<sup>+</sup>* (unten) wie angegeben mit MitoTracker Green oder MitoTracker Orange gefärbt. Von links nach rechts: prä UV, Projektion der maximalen Intensität mehrerer konfokaler Ebenen vor dem Ausbleichen (Pfeile markieren einzelne Mitochondrien, die nicht mit dem mitochondrialen Netzwerk verbunden sind.); differentieller Interferenzkontrast-Aufnahme, welche die Region des Ausbleichens (weißer Bereich) zeigt; Projektionen der maximalen Intensität mehrerer konfokaler Ebenen wurden unmittelbar nach dem Ausbleichen und anschließend in Abständen von 2 min aufgenommen. Der Größenmaßstab entspricht 5  $\mu$ m. (B) Eine Zygote mit teilweise fusionierten Mitochondrien wurde wie zuvor in Abbildung 3-16 beschrieben mittels konfokaler 3D-Mikroskopie untersucht. Abgebildet sind DIC- (differentieller Interferenzkontrast) und Fluoreszenzaufnahmen der mit MitoTracker Green (grün) und MitoTracker Orange (orange, in magenta dargestellt) gefärbten Mitochondrien sowie die Überlagerung aus grüner und oranger Fluoreszenz. Grüner Pfeil, Mitochondrium mit ausschließlich grüner Markierung; magentafarbener Pfeil, Mitochondrium mit ausschließlich oranger Markierung; weißer Pfeil, fusioniertes Mitochondrium mit grüner und oranger Markierung. Die in (B) abgebildeten Aufnahmen sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden und wurden für eine Abbildung in Scholz und Westermann (2013) verwendet. Der Größenmaßstab entspricht 5  $\mu$ m.

Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass die Mitochondrien in Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* fusionieren, wirkt sich auf den Vererbungsmechanismus der mitochondrialen DNA aus. In der isogamen Grünalge *C. reinhardtii* werden Organellengenome uniparental vererbt. Während das Genom der Plastiden von den als maternal bezeichneten *mt<sup>+</sup>*-Gameten weitervererbt wird, erfolgt die Vererbung des mitochondrialen Genoms paternal von den *mt<sup>-</sup>*-Gameten (Boynton *et al.*, 1987; Birky, 2001; Kuroiwa, 2010; Miyamura, 2010; Nakamura, 2010). Die Weitergabe der mtDNA ist im Wildtyp fast zu 100 % und in mitochondrialen Mutanten zu mehr als 70 % paternal (Nakamura, 2010). Anhand von Southern-Hybridisierungsexperimenten, PCR-Analysen, der Fluoreszenzmarkierung mitochondrialer DNA und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) konnte gezeigt werden, dass die maternale mtDNA drei bis acht Stunden nach dem Vermischen der Gameten und unmittelbar vor der ersten meiotischen Zellteilung eliminiert wird (Beckers *et al.*, 1991; Nakamura *et al.*, 2003; Aoyama *et al.*, 2006). Das langsame und graduelle Verschwinden der maternalen mtDNA führte bisher zu der Annahme, dass die maternale mtDNA durch den Abbau und Verlust der maternalen Mitochondrien verschwindet (Beckers *et al.*, 1991). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Fusion der Mitochondrien bereits wenige Minuten nach der Zygotenbildung stattfindet und zumindest im Wildtyp etwa 60 min nach dem Vermischen der Gameten fast vollständig abgeschlossen ist (Abb. 3-19 A). Demzufolge sind die Mitochondrien beider Elternstämme zum Zeitpunkt der Eliminierung der maternalen mtDNA bereits vermischt. Das Verschwinden der maternalen mtDNA kann demnach nicht durch den selektiven Abbau der maternalen Mitochondrien erfolgen. Dementsprechend muss entweder die maternale mtDNA selektiv für den Abbau markiert werden oder die paternale mtDNA wird derart modifiziert, dass sie vor dem Abbau

in den fusionierten Mitochondrien geschützt ist. Eine umfassende Methylierung der mtDNA findet jedoch beim Abbau vermutlich nicht statt (Beckers *et al.*, 1991).

In Säugerzellen wurde beobachtet, dass Mitochondrien auf zwei verschiedene Arten fusionieren können. Außer der vollständigen mitochondrialen Fusion wurde ein als „kiss-and-run“ bezeichneter Mechanismus beschrieben, bei dem Mitochondrien transient fusionierten und sich unmittelbar nach dem Austausch löslicher Matrixkomponenten wieder teilten (Liu *et al.*, 2009). Es ist bisher jedoch nicht bekannt, ob in *Chlamydomonas* ein ähnlicher Mechanismus existiert. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Mitochondrien in den Zygoten von *Chlamydomonas* nur transient fusionieren, die maternale und paternale mtDNA jedoch solange voneinander getrennt bleiben, bis die Mitochondrien mit der maternalen mtDNA abgebaut werden. Der Mechanismus für den selektiven Abbau der maternalen mtDNA in fusionierten Mitochondrien von *Chlamydomonas* bleibt bisher unverstanden.

Mit Hilfe des hier verwendeten Assays konnte erstmals die Fusion von Mitochondrien in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben werden. Um die zugrundeliegenden Mechanismen der mitochondrialen Fusion in *C. reinhardtii* besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen zur Fusion von Mitochondrien in *Chlamydomonas* erforderlich.

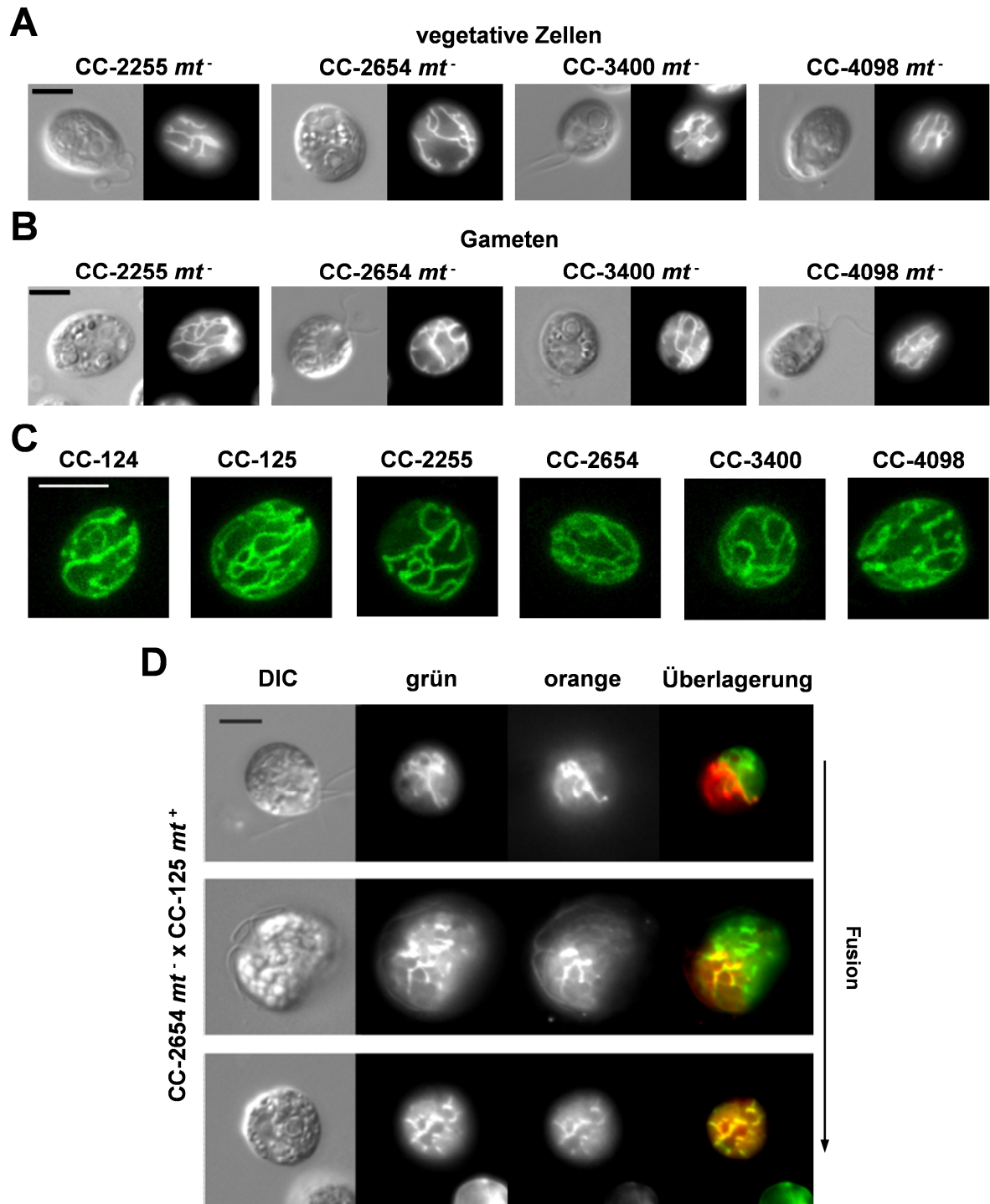
### 3.4.3. Mitochondriale Morphologie und Fusion in respiratorischen Mutanten

Um herauszufinden, ob die Mitochondrien von respiratorischen Mutanten ebenfalls fusionieren können, wurden die folgenden atmungsdefizienten Mutanten untersucht: CC-2255 *dum-1 mt<sup>-</sup>*, besitzt eine Deletion im mitochondrialen *cob*-Gen, welches für Cytochrom *b* codiert (Matagne *et al.*, 1989); CC-2654 *dum1 mt<sup>-</sup>*, ein Subklon von CC-2255 *mt<sup>-</sup>* (Randolph-Anderson *et al.*, 1993); CC-3400 *dum19 mt<sup>-</sup>* besitzt einen Frameshift im mitochondrialen *cox1*-Gen (Colin *et al.*, 1995) und CC-4098 *dum11 mt<sup>-</sup>* besitzt eine 0,7 kb Deletion im *cob*-Gen und der angrenzenden Genregion (Dorthu *et al.*, 1992; Colin *et al.*, 1995). Die bioenergetischen Eigenschaften dieser Mutanten wurden bereits ausgiebig untersucht. Allen Mutanten fehlt eine essentielle Untereinheit der Atmungskette, weshalb die mitochondriale Atmung vollständig blockiert ist und die Mutanten einen obligat photoautotrophen Wachstumsphänotyp zeigen. Der Sauerstoffverbrauch dieser Mutanten ist nicht empfindlich gegenüber Cyanid, was darauf hindeutet, dass der Sauerstoff durch andere Oxidasen verbraucht wird und die Respiration über Cytochrom blockiert ist. Darüber hinaus sind die

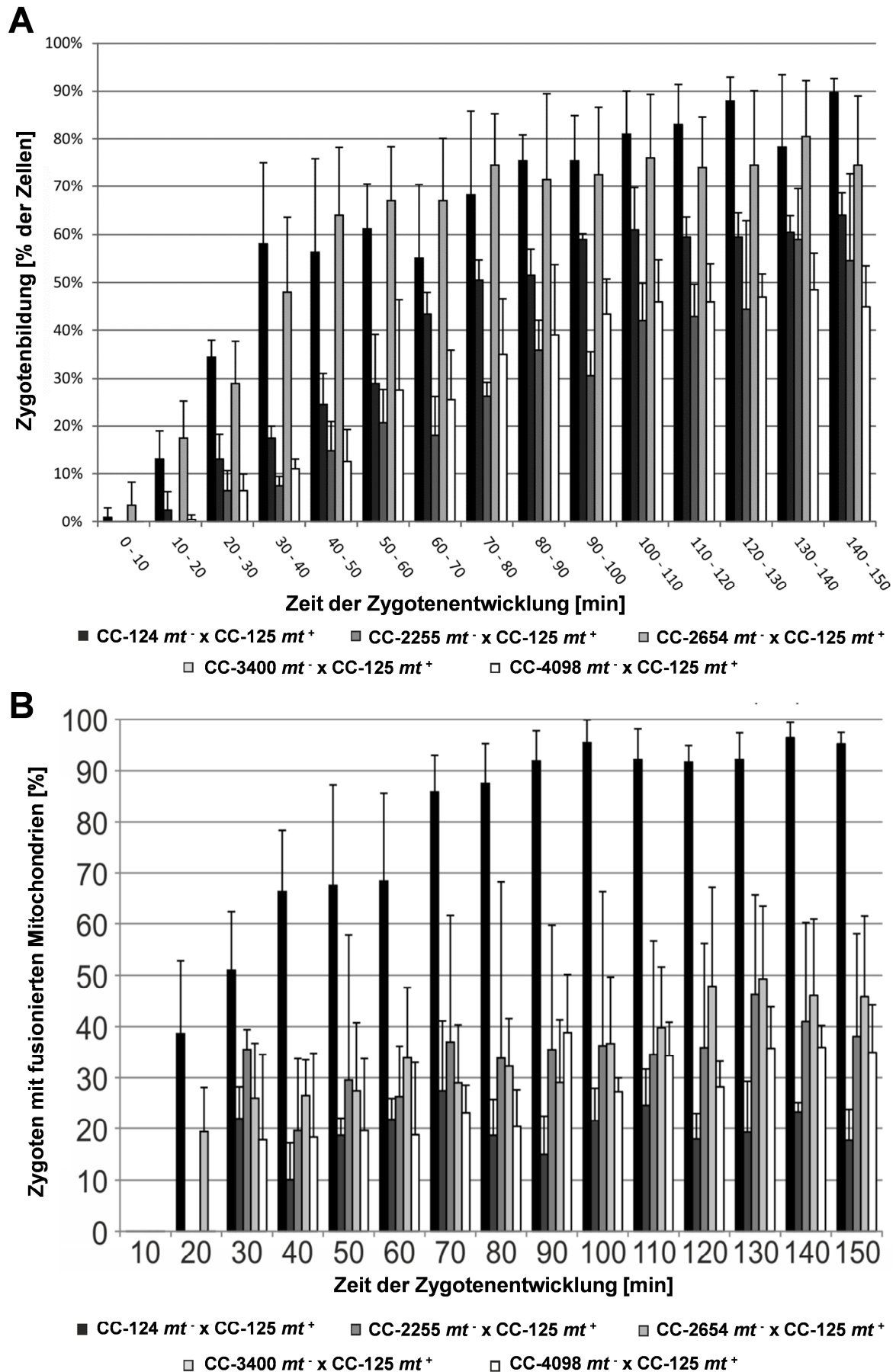
Mutanten unempfindlich gegenüber Myxothiazol und Antimycin A, welche als Inhibitoren des Atmungskettenkomplex III fungieren (Dorthu *et al.*, 1992; Remacle *et al.*, 2001).

Zur Färbung der Mitochondrien in den atmungsdefizienten Mutanten wurde MitoTracker Green verwendet. Im Gegensatz zu anderen MitoTracker-Derivaten färbt MitoTracker Green die Mitochondrien unabhängig von deren Membranpotential (Pendergrass *et al.*, 2004). Die mitochondriale Morphologie der atmungsdefizienten Mutanten entsprach der Morphologie der Mitochondrien in wildtypischen Zellen (Abb. 3-18 A und B vgl. Abb. 3-15). Um auszuschließen, dass in den atmungsdefizienten Mutanten weniger oder veränderte Mitochondrien vorliegen, wurden die mit MitoTracker Green gefärbten Zellen der WT-Stämme und Mutanten mittels konfokaler 3D-Mikroskopie untersucht. Jedoch konnte auch durch die konfokale 3D-Mikroskopie kein Unterschied in der mitochondrialen Morphologie von wildtypischen Zellen und Mutanten festgestellt werden (Abb. 3-18 C). Die Gameten der mit MitoTracker Green gefärbten Mutanten ( $mt^-$ ) wurden mit MitoTracker Orange gefärbten, wildtypischen Gameten ( $mt^+$ ) gekreuzt. Bei allen Kreuzungen konnte mitochondriale Fusion in den Zygoten beobachtet werden (repräsentative Zygoten aus der Kreuzung von CC-2654  $mt^-$  mit dem Wildtyp CC125  $mt^+$  sind in Abb. 3-18 D abgebildet). Dementsprechend sind in *C. reinhardtii* auch atmungsdefiziente Mitochondrien in der Lage zu fusionieren.

Um herauszufinden, ob die Effizienz der mitochondrialen Fusion in den Zygoten der atmungsdefizienten Mutanten verändert ist, wurden wildtypische oder atmungsdefiziente Gameten ( $mt^-$ ) mit wildtypischen  $mt^+$ -Gameten gekreuzt und der Anteil der gebildeten Zygoten zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Vermischen der Gameten bestimmt. Während bei den Kreuzungen von CC-125  $mt^+$  mit CC-124  $mt^-$  oder CC-3400  $mt^-$  die Zygoten am effizientesten gebildet wurden, erfolgte die Bildung der Zygoten bei den Kreuzungen von CC-125  $mt^+$  mit CC-2255  $mt^-$ , CC-2654  $mt^-$  oder CC-4098  $mt^-$  mit 10-20 minütiger Verzögerung (Abb. 3-19 A). Alle mitochondrialen Mutanten bildeten dennoch ausreichend viele Zygoten, um die mitochondriale Fusion innerhalb der Zygoten zu quantifizieren (Abb. 3-19 B). In den wildtypischen Zygoten konnte bereits 15 min nach dem Mischen der Gameten mitochondriale Fusion beobachtet werden und nach einer Stunde enthielten mehr als 80 % der wildtypischen Zygoten teilweise oder vollständig fusionierte Mitochondrien. Im Vergleich dazu war der Beginn mitochondrialer Fusionsereignisse in den Zygoten, die aus den Kreuzungen der mitochondrialen Mutanten mit dem Wildtyp entstanden, verzögert. Dieser verzögerte Beginn der mitochondrialen Fusionsereignisse kann jedoch auf die verzögerte Bildung von Zygoten zurückgeführt werden. Darüber hinaus war die Effizienz der mitochondrialen Fusion in den Zygoten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erheblich



**Abb. 3-18: Mitochondriale Morphologie und Fusion in atmungsdefizienten Mutanten von *C. reinhardtii* (Scholz und Westermann, 2013).** (A) Die atmungsdefizienten Mutanten wurden wie zuvor beschrieben (Abb. 3-15 A) kultiviert, mit MitoTracker Green gefärbt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Maßstab entspricht 5  $\mu$ m. (B) Die Gametogenese und Analyse der atmungsdefizienten Mutanten erfolgte wie in Abb. 3-15 B. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker Green gefärbt. Maßstab, 5  $\mu$ m. (C) Vergleich der mitochondrialen Gesamtmenge in WT-Stämmen und Mutanten. Die Gameten wurden mit MitoTracker Green gefärbt und mittels konfokaler 3D-Mikroskopie analysiert. Abgebildet sind Projektionen der maximalen Intensität mehrerer konfokaler Ebenen von repräsentativen Zellen. Maßstab, 5  $\mu$ m. (D) Die Gameten des atmungsdefizienten Stammes CC-2654 *mt*<sup>-</sup> wurden mit MitoTracker Green und die Gameten des WT-Stammes CC-125 *mt*<sup>+</sup> wurden mit MitoTracker Orange gefärbt. Im Anschluss wurden die Gameten miteinander vermischt und bei Licht inkubiert. Die Zygoten wurden 10-60 min nach Vermischung der Gameten, wie in Abb. 3-16 A beschrieben, fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Maßstab entspricht 5  $\mu$ m.



**Abb. 3-19: Quantifizierung mitochondrialer Fusionsereignisse in Zygoten von *C. reinhardtii*.**  
 (Beschreibung der Abbildung siehe Seite 79.)

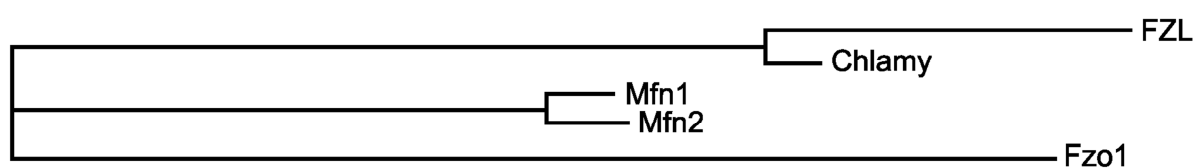
**Abb. 3-19: Quantifizierung mitochondrialer Fusionsereignisse in Zygoten von *C. reinhardtii*.** (A) Verzögerte Zygotenbildung bei Kreuzungen mit mitochondrialen Mutanten. Die Zygoten wurden durch die Paarung von wildtypischen (CC-124) oder atmungsdefizienten (CC-2255; CC-2654; CC-3400 oder CC-4098) *mf*-Gameten mit wildtypischen *mt*<sup>+</sup>-Gameten (CC-125) gebildet. Pro Stamm und Zeitintervall wurden mind. 50 Zellen analysiert. Die Balken zeigen den prozentualen Anteil der Zygoten an der Gesamtzahl der Zellen in der Suspension (% der Zellen). Die Werte sind Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (B) Die Quantifizierung der mitochondrialen Fusion erfolgte anhand der in (A) beschriebenen Zygoten, welche durch die Paarung wildtypischer bzw. atmungsdefizienter *mf*-Gameten mit wildtypischen *mt*<sup>+</sup>-Gameten entstanden. Pro Stamm und Zeitintervall wurden mind. 50 Zellen analysiert. Die Balken zeigen den prozentualen Anteil von Zygoten, die über teilweise oder vollständig fusionierte Mitochondrien verfügten. Die Werte sind Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Datenpunkte mit weniger als drei Zygoten mit beiden Farbstoffen wurden nicht berücksichtigt. Der verzögerte Beginn der mitochondrialen Fusion in Zygoten der atmungsdefizienten Mutanten ist auf die verzögerte Zygotenbildung dieser Mutanten zurückzuführen (vgl. Abb. 3-19 A). Die dargestellten Quantifizierungen entstanden im Rahmen dieser Arbeit und wurden bereits in Scholz und Westermann (2013) veröffentlicht.

verringert. Selbst nach mehr als zwei Stunden, nachdem die Gameten der Mutanten mit dem wildtypischen Gameten gekreuzt worden, enthielten nur etwa 20-50 % der Zygoten fusionierte Mitochondrien (Abb. 3-19 B). Bei einem erheblichen Anteil dieser Zygoten waren die Mitochondrien nur teilweise fusioniert. Die reduzierte Effizienz der mitochondrialen Fusion könnte möglicherweise auf das Fehlen von Komponenten der Atmungskette und dem damit verbundenen Verlust des Membranpotentials zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung der mitochondrialen Fusion in Zygoten, welche aus der Kreuzung von ausschließlich atmungsdefizienten *mf*<sup>-</sup>- und *mt*<sup>+</sup>-Gameten stammen, äußerst interessant. Leider sind die entsprechenden atmungsdefizienten *mt*<sup>+</sup>-Stämme nicht verfügbar. Durch die Kreuzung von *mf*-Mutanten mit dem Wildtypstamm CC-125 *mt*<sup>+</sup>, gefolgt von der Zygosporienbildung und der anschließenden Tetradendissektion wurde versucht, atmungsdefiziente *mt*<sup>+</sup>-Mutanten herzustellen. Aus unbekannten Gründen gelang es jedoch nicht, Nachkommen mit dem passenden Genotyp zu erhalten.

Zygoten mit fusionierten und unfusionierten Mitochondrien wurden bereits bei Hefemutanten beschrieben, welche eine reduzierte, aber nicht vollständig blockierte, mitochondriale Fusionsaktivität besitzen (Hammermeister *et al.*, 2010). In *S. cerevisiae* und Säugerzellen steht die Effizienz der mitochondrialen Fusion in Verbindung mit dem energetischen Zustand der Mitochondrien (Westermann, 2012). Mitochondrien, die in ihrer Funktionalität gestört sind, fusionieren seltener mit dem mitochondrialen Netzwerk als respiratorisch aktive Mitochondrien (Herlan *et al.*, 2004; Twig *et al.*, 2008a). Dadurch sind Zellen in der Lage, geschädigte und respiratorisch inaktive Mitochondrien selektiv zu entfernen und mittels Autophagie abzubauen. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass regelmäßige Zyklen aus mitochondrialer Fusion und Teilung zur Qualitätskontrolle der Mitochondrien in Hefen und Säugern beitragen (Twig *et al.*, 2008b; Westermann, 2010b). Die

physiologische Bedeutung der mitochondrialen Fusion in *Chlamydomonas* ist bisher unbekannt. In dieser Arbeit konnte erstmals die Fusion von Mitochondrien in *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben werden. Die mitochondriale Fusion wurde in wildtypischen Zygoten und in Zygoten von respiratorischen Mutanten beobachtet. Hierbei wurde eine verringerte Häufigkeit der mitochondrialen Fusionsereignisse in den Zygoten von atmungsdefizienten Mutanten festgestellt. Anhand dieser Beobachtungen wird geschlussfolgert, dass die Mitochondrien in *C. reinhardtii* regelmäßig fusionieren. Es bedarf jedoch weiterer Experimente um herauszufinden, ob die mitochondriale Teilung in den Mutanten auf eine ähnliche Weise beeinträchtigt ist und das Gleichgewicht aus mitochondrialer Fusion und Teilung in *Chlamydomonas* eine ähnliche Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle übernimmt, wie sie bereits bei Hefe und Säugern beschrieben wurde.

Die molekularen Komponenten der mitochondrialen Fusionsmaschinerie sind im Pilz- und Tierreich evolutionär konserviert (Westermann, 2010a, b). In den sequenzierten Genomen von Algen und höheren Pflanzen sind hingegen keine eindeutigen Orthologe zu den aus Hefe und Vielzellern bekannten mitochondrialen Fusionsproteinen zu finden. Im Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant *et al.*, 2007) wird ein einziges Homolog zu Fzo1 aus *S. cerevisiae* codiert. Dieses vorhergesagte, bisher uncharakterisierte Protein ähnelt jedoch eher dem FZL (FZO-like) Protein aus *Arabidopsis thaliana* als dem Fzo1 aus Hefe oder den Mitofusinen des Menschen (Abb. 3-20).



**Abb. 3-20: Phylogenetischer Baum von Fzo1 Homologen (Scholz und Westermann, 2013).** Der phylogenetische Baum wurde mit Hilfe der Software Clustal W 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) erstellt. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Baumformat, PHYLIP; Abstandskorrektur, tatsächlich; Lücken ausschließen, tatsächlich; Clustermethode, Neighbor-Joining; Prozent-Identitätsmatrix, unecht. Die dargestellten Proteine und deren Zugangsnummer sind nachfolgend aufgeführt: FZL, FZO-ähnliches Protein *Arabidopsis thaliana*, NP\_171815.3; Chlomy, vorhergesagtes Protein *Chlamydomonas reinhardtii*, XP\_001689811.1; Mfn1 *Homo sapiens*, NP\_284941.2; Mfn2 *Homo sapiens*, NP\_055689.1; Fzo1 *Saccharomyces cerevisiae*, NP\_009738.

Da das FZL Protein aus *Arabidopsis* ausschließlich in den Chloroplasten lokalisiert ist und eine Rolle bei der Organisation der Thylakoide spielt (Gao *et al.*, 2006), ist eine Beteiligung des homologen Proteins von *Chlamydomonas* an der mitochondrialen Fusion unwahrscheinlich. Eukaryotische Organismen verfügen über mehrere Dynamin-verwandte



GTPasen, die an verschiedenen Umformungsprozessen von Membranen beteiligt sind (Praefcke und McMahon, 2004). Das Genom von *Chlamydomonas* umfasst sieben Gene, die für mögliche Dynamin-verwandte Proteine codieren. Anders als bei Mgm1 in Hefe oder bei OPA1 in Vielzellern besitzt keines dieser vorhergesagten *Chlamydomonas*-Proteine eine charakteristische mitochondriale Präsequenz am N-Terminus. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass diese Proteine der Dynaminfamilie nicht an der Fusion der mitochondrialen Innenmembran, sondern an anderen membranumformenden Prozessen beteiligt sind. Darüber hinaus codiert das Genom von *C. reinhardtii* kein Homolog zum mitochondrialen Außenmembranprotein Ugo1, welches in *S. cerevisiae* für die mitochondriale Fusion notwendig ist (Sesaki und Jensen, 2001). Die Identifizierung von Proteinen der mitochondrialen Fusionsmaschinerie in Pflanzen und die damit verbundenen molekularen Mechanismen und physiologischen Funktionen bleiben eine Herausforderung, die es zukünftig zu lösen gilt.

## 4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der mitochondrialen Dynamik mit Hilfe von unterschiedlichen licht- und elektronenmikroskopischen Methoden in *S. cerevisiae* untersucht. Um die mitochondriale Morphologie und Dynamik in *S. cerevisiae* zeitaufgelöst verfolgen zu können, wurde eine vielseitig einsetzbare Sammlung von Reporterplasmiden hergestellt, welche insbesondere für die Verwendung im Photokonversionsassay geeignet sind. Auf Grundlage des grün-zu-rot konvertierbaren Fluoreszenzproteins Dendra2 konnten individuelle Mitochondrien spezifisch markiert und die Bewegung dieser Mitochondrien innerhalb einer Zelle nachverfolgt werden.

Da das Dynamin-verwandte Protein Dnm1, welches in *S. cerevisiae* eine Schlüsselkomponente der mitochondrialen Teilung darstellt, zusätzlich zur Teilung der mitochondrialen Außenmembran auch für die Teilung der mitochondrialen Innenmembran verantwortlich sein könnte, wurde der Photokonversionsassay dafür verwendet, eine mögliche Beteiligung von Dnm1 an der Teilung der mitochondrialen Innenmembran zu untersuchen. In Kombination mit fluoreszenzmarkierten Dnm1-Varianten wurde mit Hilfe des Photokonversionsassays gezeigt, dass an den Assemblierungspunkten von Dnm1 eine Diskontinuität innerhalb der mitochondrialen Matrix entsteht. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von mutmaßlichen Dnm1-Bindestellen konnten vollständig voneinander getrennte Innenmembranen oder sich gegenüberliegende Cristae als mögliche Ursachen für die Diskontinuität der mitochondrialen Matrix identifiziert werden. Um mit Sicherheit festzustellen, ob es sich bei den ultrastrukturell untersuchten Einschnürungen der Mitochondrien tatsächlich um Dnm1-Bindestellen handelt, muss der immuno-elektronenmikroskopische Nachweis von Dnm1 an den mitochondrialen Einschnürungen in zukünftigen Experimenten erfolgen.

Anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnte eine direkte Beteiligung von Dnm1 bei der Teilung der mitochondrialen Innenmembran nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es besteht aber offenbar ein Zusammenhang zwischen der Assemblierung von Dnm1 an der mitochondrialen Außenmembran und der Kontinuität der mitochondrialen Matrix. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass die Teilung der mitochondrialen Innenmembran nicht direkt durch Dnm1 erfolgt, aber in Koordination mit den Assemblierungspunkten von Dnm1 stattfindet. Wie genau die Teilung der mitochondrialen Innenmembran erfolgt und welche Komponenten daran beteiligt sind, müssen zukünftige Experimente zeigen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, auf welche

Weise die Teilung der mitochondrialen Innenmembran mit der Teilung der mitochondrialen Außenmembran koordiniert wird. Auch die Frage nach welchen Kriterien die Stellen der mitochondrialen Teilung festgelegt werden, bleibt bisher unbeantwortet und muss in zukünftigen Untersuchungen gelöst werden.

Ein weiterer Aspekt der im Zusammenhang mit der mitochondrialen Dynamik in dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Num1-vermittelte Verankerung der Mitochondrien. Bei elektronentomographischen Untersuchungen der mitochondrialen Verankerungsstellen am Zellkortex konnten Einstülpungen der Plasmamembran beobachtet werden, welche direkte Kontakte zur mitochondrialen Außenmembran bildeten. Dementsprechend wurde angenommen, dass die Befestigung der Mitochondrien in der Mutterzelle über Kontakte mit der Plasmamembran erfolgt. Um die genaue Lokalisation von Num1 am Zellkortex zu bestimmen, sind in Zukunft weitere immuno-elektronenmikroskopische Untersuchungen notwendig.

Obwohl eine große Ähnlichkeit zwischen den Membraneinstülpungen der mitochondrialen Verankerungsstellen und den durch Eisosomen gebildeten Membraneinstülpungen besteht, konnte kein unmittelbarer Zusammenhang von Eisosomen und der Num1-vermittelten Verankerung von Mitochondrien nachgewiesen werden. Aus diesem Grund könnte es sich bei den beschriebenen Membraneinstülpungen einerseits um funktionell verschiedene Kompartimente handeln, andererseits wäre es auch denkbar, dass zunächst die Bildung einer Membraninvagination durch die Eisosomen erfolgt und die gebildete Membraneinstülpung anschließend für die Num1-vermittelte Mitochondrienverankerung am Zellkortex dient. Ein derartiges Modell könnte in zukünftigen Untersuchungen durch zeitaufgelöste Elektronentomografie (Kukulski *et al.*, 2012) getestet werden. Die Kontakte zwischen den Mitochondrien und der Plasmamembran sind ein bestimmender Faktor für die mitochondriale Morphologie und Dynamik in Hefe. In höheren Eukaryoten sind jedoch keine homologen Proteine zu Num1 bekannt. Demzufolge müssen zukünftige Untersuchungen zeigen, ob ähnliche Mechanismen für die Verankerung der Mitochondrien in anderen eukaryotischen Zellen existieren. Eine weitere zentrale Frage, welche im Zusammenhang mit Num1 weiterführend untersucht werden sollte, ist die biologische Bedeutung der Num1-vermittelten Verankerung von Mitochondrien. Es wird angenommen, dass die Verankerung von Mitochondrien durch Num1 für die richtige Vererbung der Mitochondrien und die Weitergabe der mitochondrialen DNA entscheidend ist. In der vorliegenden Arbeit konnte durch verschiedene Experimente, beispielsweise anhand der Expression von Abf2-Dendra2, gezeigt werden, dass sich der

Photokonversionsassay ideal für die Untersuchung der mitochondrialen Vererbung bzw. der Weitergabe von Nukleoiden eignet.

Während die verschiedenen Prozesse der mitochondrialen Dynamik in *S. cerevisiae* und Säugetieren sehr gut untersucht sind, existieren über die Dynamik der Mitochondrien in Algen und höheren Pflanzen nur sehr wenige Daten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die mitochondriale Fusion auch in der einzelligen Grünalge *C. reinhardtii* beobachtet werden kann. Die mitochondriale Fusion wurde in wildtypischen Zygoten und mit geringerer Effizienz in Zygoten von atmungsdefizienten Mutanten festgestellt. Anhand dieser Ergebnisse wurde geschlossen, dass die Mitochondrien in *C. reinhardtii* regelmäßig fusionieren. Da die an der mitochondrialen Fusion beteiligten Proteine in *Chlamydomonas* bisher vollkommen unbekannt sind, bleibt deren Identifizierung eine wichtige Aufgabe für zukünftige Untersuchungen.

Durch die Verwendung von unterschiedlichen licht- und elektronenmikroskopischen Methoden ließen sich im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche neue Erkenntnisse über die verschiedenen Prozesse der mitochondrialen Dynamik gewinnen. Basierend auf den hier gezeigten Daten stellen sich jedoch zahlreiche interessante Fragen, die es zukünftig zu beantworten gilt.

## 5. Literaturverzeichnis

- Achleitner, G., Gaigg, B., Krasser, A., Kainersdorfer, E., Kohlwein, S.D., Perktold, A., Zellnig, G. und Daum, G. (1999). Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur. J. Biochem.* 264, 545-553.
- Adams, K.L. und Palmer, J.D. (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 380-395.
- Alberti, S., Gitler, A.D. und Lindquist, S. (2007). A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24, 913-919.
- Altmann, K., Dürr, M. und Westermann, B. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures. *Methods Mol. Biol.* 372, 81-90.
- Altmann, K., Frank, M., Neumann, D., Jakobs, S. und Westermann, B. (2008). The class V myosin motor protein, Myo2, plays a major role in mitochondrial motility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 181, 119-130.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F. *et al.* (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Aoyama, H., Hagiwara, Y., Misumi, O., Kuroiwa, T. und Nakamura, S. (2006). Complete elimination of maternal mitochondrial DNA during meiosis resulting in the paternal inheritance of the mitochondrial genome in *Chlamydomonas* species. *Protoplasma* 228, 231-242.
- Aoyama, H., Kuroiwa, T. und Nakamura, S. (2009). The dynamic behaviour of mitochondria in living zygotes during maturation and meiosis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Phycol.* 44, 497-507.
- Arimura, S. und Tsutsumi, N. (2002). A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in *Arabidopsis* mitochondrial division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5727-5731.
- Arimura, S., Aida, G.P., Fujimoto, M., Nakazono, M. und Tsutsumi, N. (2004a). *Arabidopsis* dynamin-like protein 2a (ADL2a), like ADL2b, is involved in plant mitochondrial division. *Plant Cell Physiol.* 45, 236-242.
- Arimura, S., Yamamoto, J., Aida, G.P., Nakazono, M. und Tsutsumi, N. (2004b). Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7805-7808.
- Attardi, G. und Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 289-333.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. und Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Bauer, C., Herzog, V. und Bauer, M.F. (2001). Improved technique for electron microscope visualization of yeast membrane structure. *Microsc. Microanal.* 7, 530-534.
- Beckers, M.C., Munaut, C., Minet, A. und Matagne, R.F. (1991). The fate of mitochondrial DNAs of *mt<sup>+</sup>* and *mt<sup>-</sup>* origin in gametes and zygotes of *Chlamydomonas*. *Curr. Genet.* 20, 239-243.
- Benard, G. und Karbowski, M. (2009). Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 365-374.
- Benda, C. (1898). Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertrebraten. II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. *Verh. Berl. Physiol. Ges.* 393-398.
- Bereiter-Hahn, J. und Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27, 198-219.
- Berger, K.H., Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1997). Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J. Cell Biol.* 136, 545-553.
- Bhar, D., Karren, M.A., Babst, M. und Shaw, J.M. (2006). Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1. *J. Biol. Chem.* 281, 17312-17320.

- Birky Jr., C.W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* 35, 125-148.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. und Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1, 298-304.
- Böckler, S. und Westermann, B. (2014). Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast. *Dev. Cell* 28, 450-458.
- Boldogh, I.R., Nowakowski, D.W., Yang, H.C., Chung, H., Karmon, S., Royes, P. und Pon, L.A. (2003). A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol. Biol. Cell* 14, 4618-4627.
- Boynton, J.E., Harris, E.H., Burkhart, B.D., Lamerson, P.M. und Gillham, N.W. (1987). Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2391-2395.
- Brach, T., Specht, T. und Kaksonen, M. (2011). Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *J. Cell Sci.* 124, 328-337.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. und Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
- Breckenridge, D.G., Kang, B.H., Kokel, D., Mitani, S., Staehelin, L.A. und Xue, D. (2008). *Caenorhabditis elegans* *drp-1* and *fis-2* regulate distinct cell-death execution pathways downstream of *ced-3* and independent of *ced-9*. *Mol. Cell* 31, 586-597.
- Bui, H.T., Karren, M.A., Bhar, D. und Shaw, J.M. (2012). A novel motif in the yeast mitochondrial dynamin Dnm1 is essential for adaptor binding and membrane recruitment. *J. Cell Biol.* 199, 613-622.
- Bulina, M.E., Chudakov, D.M., Britanova, O.V., Yanushevich, Y.G., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Merzlyak, E.M., Shkrob, M.A., Lukyanov, S. und Lukyanov, K.A. (2006). A genetically encoded photosensitizer. *Nat. Biotechnol.* 24, 95-99.
- Burgess, S.M., Delannoy, M. und Jensen, R.E. (1994). *MMM1* encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* 126, 1375-1391.
- Catlett, N.L. und Weisman, L.S. (2000). Divide and multiply: organelle partitioning in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 509-516.
- Cavalier-Smith, T. (1983). Endosymbiotic origin of the mitochondrial envelope. In: Schwemmler, W. und Schenk, H.E.A. (Editoren), *Endocytobiology II*, de Gruyter, Berlin, 265-279.
- Cervený, K.L., Studer, S.L., Jensen, R.E. und Sesaki, H. (2007). Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical Num1 protein. *Dev. Cell* 12, 363-375.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. und Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628-644.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. und Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241-1252.
- Chang, C.R., Manlandro, C.M., Arnoult, D., Stadler, J., Posey, A.E., Hill, R.B. und Blackstone, C. (2010). A lethal *de novo* mutation in the middle domain of the dynamin-related GTPase Drp1 impairs higher order assembly and mitochondrial division. *J. Biol. Chem.* 285, 32494-32503.
- Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C. und Vallee, R.B. (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by *shibire*, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* 351, 583-586.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E. und Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160, 189-200.
- Chen, H., Chomyn, A. und Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* 280, 26185-26192.
- Chen, X.J. und Butow, R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* 6, 815-825.

- Chernyakov, I., Santiago-Tirado, F. und Bretscher, A. (2013). Active segregation of yeast mitochondria by Myo2 is essential and mediated by Mmr1 and Ypt11. *Curr. Biol.* 23, 1818-1824.
- Chinault, A.C., Shaw, C.A., Brundage, E.K., Tang, L.Y. und Wong, L.J. (2009). Application of dual-genome oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization to the molecular diagnosis of mitochondrial DNA deletion and depletion syndromes. *Genet. Med.* 11, 518-526.
- Cho, D.H., Nakamura, T. und Lipton, S.A. (2010). Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3435-3447.
- Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S. und Lukyanov, K.A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* 90, 1103-1163.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B. und Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15927-15932.
- Colin, M., Dorthu, M.P., Duby, F., Rémacle, C., Dinant, M., Wolwertz, M.R., Duyckaerts, C., Sluse, F. und Matagne, R.F. (1995). Mutations affecting the mitochondrial genes encoding the cytochrome oxidase subunit I and apocytochrome *b* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* 249, 179-184.
- Coonrod, E.M., Karren, M.A. und Shaw, J.M. (2007). Ugo1p is a multipass transmembrane protein with a single carrier domain required for mitochondrial fusion. *Traffic* 8, 500-511.
- Cox, C.J., Foster, P.G., Hirt, R.P., Harris, S.R. und Embley, T.M. (2008). The archaeobacterial origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 20356-20361.
- Deng, H., Dodson, M.W., Huang, H. und Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes *pink1* and *parkin* promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 14503-14508.
- Desagher, S. und Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10, 369-377.
- Detmer, S.A. und Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 870-879.
- Diffley, J.F. und Stillman, B. (1991). A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7864-7868.
- Diffley, J.F. und Stillman, B. (1992). DNA binding properties of an HMG1-related protein from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 267, 3368-3374.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 13, 847-853.
- Dimmer, K.S., Jakobs, S., Vogel, F., Altmann, K. und Westermann, B. (2005). Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J. Cell Biol.* 168, 103-115.
- Dorsman, J.C. und Grivell, L.A. (1990). Expression of the gene encoding subunit II of yeast QH2: cytochrome c oxidoreductase is regulated by multiple factors. *Curr. Genet.* 17, 459-464.
- Dorthu, M.P., Remy, S., Michel-Wolwertz, M.R., Colleaux, L., Breyer, D., Beckers, M.C., Englebert, S., Duyckaerts, C., Sluse, F.E. und Matagne, R.F. (1992). Biochemical, genetic and molecular characterization of new respiratory-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 18, 759-772.
- Douglas, L.M., Wang, H.X., Li, L. und Konopka, J.B. (2011). Membrane compartment occupied by Can1 (MCC) and Eisosome subdomains of the fungal plasma membrane. *Membranes* 1, 394-411.
- Drubin, D.G., Jones, H.D. und Wertman, K.F. (1993). Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol. Biol. Cell* 4, 1277-1294.
- Egner, A., Jakobs, S. und Hell, S.W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3370-3375.
- Ehara, T., Osafune, T. und Hase, E. (1995). Behavior of mitochondria in synchronized cells of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J. Cell Sci.* 108 (Pt 2), 499-507.
- Fagarasanu, A. und Rachubinski, R.A. (2007). Orchestrating organelle inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 528-538.

- Fannjiang, Y., Cheng, W.C., Lee, S.J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J.M., Hill, R.B., Basanez, G. und Hardwick, J.M. (2004). Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev.* 18, 2785-2797.
- Farkasovsky, M. und Küntzel, H. (2001). Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J. Cell Biol.* 152, 251-262.
- Fehrenbacher, K.L., Yang, H.C., Gay, A.C., Huckaba, T.M. und Pon, L.A. (2004). Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast. *Curr. Biol.* 14, 1996-2004.
- Förtsch, J., Hummel, E., Krist, M. und Westermann, B. (2011). The myosin-related motor protein Myo2 is an essential mediator of bud-directed mitochondrial movement in yeast. *J. Cell Biol.* 194, 473-488.
- Foury, F. (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene *MIP1* encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 264, 20552-20560.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. und Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440, 325-331.
- Foury, F. und Kucej, M. (2002). Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 106-111.
- Frey, T.G. und Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319-324.
- Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J. und Voeltz, G.K. (2010). ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* 190, 363-375.
- Friedman, J.R. und Voeltz, G.K. (2011). The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol.* 21, 709-717.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J. und Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358-362.
- Friedman, J.R. und Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335-343.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. und Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* 152, 683-692.
- Fröhlich, F., Moreira, K., Aguilar, P.S., Hubner, N.C., Mann, M., Walter, P. und Walther, T.C. (2009). A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *J. Cell Biol.* 185, 1227-1242.
- Fukushima, N.H., Brisch, E., Keegan, B.R., Bleazard, W. und Shaw, J.M. (2001). The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* 12, 2756-2766.
- Gabaldon, T. und Huynen, M.A. (2007). From endosymbiont to host-controlled organelle: the hijacking of mitochondrial protein synthesis and metabolism. *PLoS Comput. Biol.* 3, e219.
- Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 334-361.
- Gao, H., Sage, T.L. und Osteryoung, K.W. (2006). FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6759-6764.
- Ghaemmighami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K. und Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B. *et al.* (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387-391.
- Gietz, R.D. und Schiestl, R.H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2, 31-34.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M. *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-567.
- Gorsich, S.W. und Shaw, J.M. (2004). Importance of mitochondrial dynamics during meiosis and sporulation. *Mol. Biol. Cell* 15, 4369-4381.
- Gray, M.W. und Boer, P.H. (1988). Organization and expression of algal (*Chlamydomonas reinhardtii*) mitochondrial DNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 319, 135-147.



- Gray, M.W., Burger, G. und Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Gray, M.W., Burger, G. und Lang, B.F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* 2, reviews 1018.
- Green, D.R. und Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Green, M.R. und Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Griffin, E.E., Graumann, J. und Chan, D.C. (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J. Cell Biol.* 170, 237-248.
- Griffin, E.E., Detmer, S.A. und Chan, D.C. (2006). Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 482-489.
- Griffith, J., Mari, M., De Maziere, A. und Reggiori, F. (2008). A cryosectioning procedure for the ultrastructural analysis and the immunogold labelling of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 9, 1060-1072.
- Grivell, L.A. (1995). Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 121-164.
- Grivell, L.A., Artal-Sanz, M., Hakkaart, G., de Jong, L., Nijtmans, L.G., van Oosterum, K., Siep, M. und van der Spek, H. (1999). Mitochondrial assembly in yeast. *FEBS Lett.* 452, 57-60.
- Grobe, B. und Arnold, C.G. (1975). Evidence of a large, ramified mitochondrion in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma* 86, 291-294.
- Grobe, B. und Arnold, C.G. (1977). The behaviour of mitochondria in the zygote of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma* 93, 357-361.
- Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlschmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W.B., Opekarova, M. und Tanner, W. (2008). Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J. Cell Biol.* 183, 1075-1088.
- Gurskaya, N.G., Verkhusha, V.V., Shcheglov, A.S., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Fradkov, A.F., Lukyanov, S. und Lukyanov, K.A. (2006). Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat. Biotechnol.* 24, 461-465.
- Hales, K.G. und Fuller, M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121-129.
- Hammermeister, M., Schödel, K. und Westermann, B. (2010). Mdm36 is a mitochondrial fission-promoting protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 21, 2443-2452.
- Harner, M., Körner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F. und Neupert, W. (2011). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* 30, 4356-4370.
- Harris, E.H. (2001). *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 363-406.
- Hartley, J.L., Temple, G.F. und Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res.* 10, 1788-1795.
- Heinicke, S., Livstone, M.S., Lu, C., Oughtred, R., Kang, F., Angiuoli, S.V., White, O., Botstein, D. und Dolinski, K. (2007). The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *PLoS One* 2, e766.
- Heo, J.M., Nielson, J.R., Dephoure, N., Gygi, S.P. und Rutter, J. (2013). Intramolecular interactions control Vms1 translocation to damaged mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 24, 1263-1273.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W. und Reichert, A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 278, 27781-27788.
- Herlan, M., Bornhövd, C., Hell, K., Neupert, W. und Reichert, A.S. (2004). Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J. Cell Biol.* 165, 167-173.
- Hermann, G.J. und Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 265-303.

- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J. und Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* 143, 359-373.
- Hobbs, A.E., Srinivasan, M., McCaffery, J.M. und Jensen, R.E. (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J. Cell Biol.* 152, 401-410.
- Hoffmann, H.P. und Avers, C.J. (1973). Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science* 181, 749-751.
- Hoppins, S., Lackner, L. und Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 751-780.
- Hoppins, S., Horner, J., Song, C., McCaffery, J.M. und Nunnari, J. (2009). Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J. Cell Biol.* 184, 569-581.
- Hoppins, S., Collins, S.R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., Devay, R.M., Lackner, L.L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J.S. und Nunnari, J. (2011). A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J. Cell Biol.* 195, 323-340.
- Hoppins, S. und Nunnari, J. (2012). Cell Biology. Mitochondrial dynamics and apoptosis-the ER connection. *Science* 337, 1052-1054.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. und O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E. und Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J. Cell Biol.* 170, 1021-1027.
- Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y. und Mihara, K. (2003). Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 891-898.
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., *et al.* (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* 11, 958-966.
- Itoh, T., Watabe, A., Toh, E.A. und Matsui, Y. (2002). Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 22, 7744-7757.
- Itoh, T., Toh, E.A. und Matsui, Y. (2004). Mmr1p is a mitochondrial factor for Myo2p-dependent inheritance of mitochondria in the budding yeast. *Embo J.* 23, 2520-2530.
- Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M. und Sesaki, H. (2013). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol.* 23, 64-71.
- Jagasia, R., Grote, P., Westermann, B. und Conradt, B. (2005). DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* 433, 754-760.
- Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A.C., Egner, A., Westermann, B. und Hell, S.W. (2003a). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J. Cell Sci.* 116, 2005-2014.
- Jakobs, S., Schauss, A.C. und Hell, S.W. (2003b). Photoconversion of matrix targeted GFP enables analysis of continuity and intermixing of the mitochondrial lumen. *FEBS Lett.* 554, 194-200.
- Jakobs, S. (2006). High resolution imaging of live mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 561-575.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E. *et al.* (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947-962.
- Jin, J.B., Bae, H., Kim, S.J., Jin, Y.H., Goh, C.H., Kim, D.H., Lee, Y.J., Tse, Y.C., Jiang, L. und Hwang, I. (2003). The *Arabidopsis* dynamin-like proteins ADL1C and ADL1E play a critical role in mitochondrial morphogenesis. *Plant Cell* 15, 2357-2369.
- Johnston, M. (1999). Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.* 15, 29-33.
- Jones, B.A. und Fangman, W.L. (1992). Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* 6, 380-389.

- Kanazawa, T., Zappaterra, M.D., Hasegawa, A., Wright, A.P., Newman-Smith, E.D., Buttle, K.F., McDonald, K., Mannella, C.A. und van der Bliek, A.M. (2008). The *C. elegans* Opa1 homologue EAT-3 is essential for resistance to free radicals. *PLoS Genet.* 4, e1000022.
- Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D.C., Smith, C.L. und Youle, R.J. (2004). Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J. Cell Biol.* 164, 493-499.
- Kastenmayer, J.P., Ni, L., Chu, A., Kitchen, L.E., Au, W.C., Yang, H., Carter, C.D., Wheeler, D., Davis, R.W., Boeke, J.D. *et al.* (2006). Functional genomics of genes with small open reading frames (sORFs) in *S. cerevisiae*. *Genome Res.* 16, 365-373.
- Kelly, D.P. und Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 18, 357-368.
- Kennedy, E.P. und Lehninger, A.L. (1949). Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 179, 957-972.
- Keppeler-Ross, S., Noffz, C. und Dean, N. (2008). A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Genetics* 179, 705-710.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. und Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* 18, 3981-3989.
- Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janaky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D.J., Balk, J., Rotte, C. *et al.* (2005). Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J.* 24, 589-598.
- Klecker, T., Scholz, D., Förtsch, J. und Westermann, B. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *J. Cell Sci.* 126, 2924-2930.
- Koenig, J.H. und Ikeda, K. (1989). Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J. Neurosci.* 9, 3844-3860.
- Kormanec, J., Schaaff-Gerstenschläger, I., Zimmermann, F.K., Perecko, D. und Küntzel, H. (1991). Nuclear migration in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the highly repetitive 313 kDa NUM1 protein. *Mol. Gen. Genet.* 230, 277-287.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S. und Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325, 477-481.
- Kornmann, B. und Walter, P. (2010). ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J. Cell Sci.* 123, 1389-1393.
- Kosaka, T. und Ikeda, K. (1983a). Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 14, 207-225.
- Kosaka, T. und Ikeda, K. (1983b). Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, *shibire<sup>ts1</sup>*. *J. Cell Biol.* 97, 499-507.
- Kremer, J.R., Mastronarde, D.N. und McIntosh, J.R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J. Struct. Biol.* 116, 71-76.
- Kucej, M. und Butow, R.A. (2007). Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids. *Trends Cell Biol.* 17, 586-592.
- Kukulski, W., Schorb, M., Kaksonen, M. und Briggs, J.A. (2012). Plasma membrane reshaping during endocytosis is revealed by time-resolved electron tomography. *Cell* 150, 508-520.
- Kuroiwa, T. (2010). Review of cytological studies on cellular and molecular mechanisms of uniparental (maternal or paternal) inheritance of plastid and mitochondrial genomes induced by active digestion of organelle nuclei (nucleoids). *J. Plant Res.* 123, 207-230.
- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A. und van der Bliek, A.M. (1999). *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell* 4, 815-826.
- Lackner, L.L., Horner, J.S. und Nunnari, J. (2009). Mechanistic analysis of a dynamin effector. *Science* 325, 874-877.
- Lackner, L.L. und Nunnari, J.M. (2009). The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 1138-1144.

- Lackner, L.L., Ping, H., Graef, M., Murley, A. und Nunnari, J. (2013). Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *110*, E458-E467.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.
- Lane, N. und Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature* *467*, 929-934.
- Lang, B.F., Gray, M.W. und Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* *33*, 351-397.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R. *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* *23*, 2947-2948.
- Lascatos, G., Garway-Heath, D.F., Willoughby, C.E., Chau, K.Y. und Schapira, A.H. (2012). Mitochondrial dysfunction in glaucoma: understanding genetic influences. *Mitochondrion* *12*, 202-212.
- Lazzarino, D.A., Boldogh, I., Smith, M.G., Rosand, J. und Pon, L.A. (1994). Yeast mitochondria contain ATP-sensitive, reversible actin-binding activity. *Mol. Biol. Cell* *5*, 807-818.
- Lecrenier, N., van der Bruggen, P. und Foury, F. (1997). Mitochondrial DNA polymerases from yeast to man: a new family of polymerases. *Gene* *185*, 147-152.
- Lecrenier, N. und Foury, F. (2000). New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* *246*, 37-48.
- Leem, J. und Koh, E.H. (2012). Interaction between mitochondria and the endoplasmic reticulum: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Exp. Diabetes Res.* *2012*, 242984-242992.
- Legesse-Miller, A., Massol, R.H. und Kirchhausen, T. (2003). Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1953-1963.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. und Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4343-4354.
- Lehninger, A.L. (1964). The mitochondrion. WA Benjamin Inc., New York, USA
- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. und Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* *119*, 873-887.
- Lill, R. und Mühlenhoff, U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 457-486.
- Lippincott-Schwartz, J. und Patterson, G.H. (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* *300*, 87-91.
- Lippincott-Schwartz, J. und Patterson, G.H. (2008). Fluorescent proteins for photoactivation experiments. *Methods Cell Biol.* *85*, 45-61.
- Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O. und Hajnoczky, G. (2009). Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J.* *28*, 3074-3089.
- Logan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion, division and positioning in plants. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 789-795.
- Lukyanov, K.A., Chudakov, D.M., Lukyanov, S. und Verkhusha, V.V. (2005). Innovation: Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 885-891.
- Maleszka, R., Skelly, P.J. und Clark-Walker, G.D. (1991). Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *Embo J.* *10*, 3923-3929.
- Manford, A.G., Stefan, C.J., Yuan, H.L., Macgurn, J.A. und Emr, S.D. (2012). ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Dev. Cell* *23*, 1129-1140.
- Mannella, C.A. (2008). Structural diversity of mitochondria: functional implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1147*, 171-179.
- Mastronarde, D.N. (2005). Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J. Struct. Biol.* *152*, 36-51.
- Matagne, R.F., Michel-Wolwertz, M.R., Munaut, C., Duyckaerts, C. und Sluse, F. (1989). Induction and characterization of mitochondrial DNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* *108*, 1221-1226.

- Mattenberger, Y., James, D.I. und Martinou, J.C. (2003). Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin. *FEBS Lett.* 538, 53-59.
- McFaline-Figueroa, J.R., Vevea, J., Swayne, T.C., Zhou, C., Liu, C., Leung, G., Boldogh, I.R. und Pon, L.A. (2011). Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell* 10, 885-895.
- McKinney, S.A., Murphy, C.S., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W. und Looger, L.L. (2009). A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat Methods* 6, 131-133.
- McQuibban, G.A., Saurya, S. und Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 423, 537-541.
- McQuibban, G.A., Lee, J.R., Zheng, L., Juusola, M. und Freeman, M. (2006). Normal mitochondrial dynamics requires rhomboid-7 and affects *Drosophila* lifespan and neuronal function. *Curr. Biol.* 16, 982-989.
- Mears, J.A., Lackner, L.L., Fang, S., Ingberman, E., Nunnari, J. und Hinshaw, J.E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 20-26.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Marechal-Drouard, L. *et al.* (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245-250.
- Meeusen, S. und Nunnari, J. (2003). Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J. Cell Biol.* 163, 503-510.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M. und Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed *in vitro*. *Science* 305, 1747-1752.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M. und Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383-395.
- Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K.S., Neupert, W. und Westermann, B. (2003). The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 160, 553-564.
- Michaelis, G., Vahrenholz, C. und Pratje, E. (1990). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the gene for apocytochrome b and the complete functional map of the 15.8 kb DNA. *Mol. Gen. Genet.* 223, 211-216.
- Miyamura, S. (2010). Cytoplasmic inheritance in green algae: patterns, mechanisms and relation to sex type. *J. Plant Res.* 123, 171-184.
- Molina, A.J. und Shirihai, O.S. (2009). Monitoring mitochondrial dynamics with photoactivatable green fluorescent protein. *Methods Enzymol.* 457, 289-304.
- Moreira, K.E., Schuck, S., Schrul, B., Frohlich, F., Moseley, J.B., Walther, T.C. und Walter, P. (2012). Seg1 controls eisosome assembly and shape. *J. Cell Biol.* 198, 405-420.
- Morris, G.J., Coulson, G.E. und Leeson, E.A. (1985). Changes in the shape of mitochondria following osmotic stress to the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Sci.* 76, 145-153.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M. und Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* 151, 367-380.
- Murley, A., Lackner, L.L., Osman, C., West, M., Voeltz, G.K., Walter, P. und Nunnari, J. (2013). ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *eLife* 2, e00422.
- Muster, B., Kohl, W., Wittig, I., Strecker, V., Joos, F., Haase, W., Bereiter-Hahn, J. und Busch, K. (2010). Respiratory chain complexes in dynamic mitochondria display a patchy distribution in life cells. *PLoS One* 5, e11910.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I. und Hayashi, J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat. Med.* 7, 934-940.
- Nakamura, S., Aoyama, H. und van Woesik, R. (2003). Strict paternal transmission of mitochondrial DNA of *Chlamydomonas* species is explained by selection against maternal nucleoids. *Protoplasma* 221, 205-210.

- Nakamura, S. (2010). Paternal inheritance of mitochondria in *Chlamydomonas*. *J. Plant Res.* 123, 163-170.
- Nass, M.M. und Nass, S. (1963). Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J. Cell Biol.* 19, 593-611.
- Naylor, K., Ingeman, E., Okreglak, V., Marino, M., Hinshaw, J.E. und Nunnari, J. (2006). Mdv1 interacts with assembled Dnm1 to promote mitochondrial division. *J. Biol. Chem.* 281, 2177-2183.
- Neupert, W. und Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 723-749.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W. und Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell* 8, 1233-1242.
- Nunnari, J. und Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145-1159.
- Okamoto, K. und Shaw, J.M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 39, 503-536.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. und Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743-7746.
- Olivera-Couto, A., Grana, M., Harispe, L. und Aguilar, P.S. (2011). The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Mol. Biol. Cell* 22, 2360-2372.
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. und Hayashi, J.I. (2001). Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.* 28, 272-275.
- Osafune, T., Mihara, S., Hase, E. und Ohkuro, I. (1972). Electron microscope studies on the vegetative cellular life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in synchronous culture I. Some characteristics of changes in subcellular structures during the cell cycle, especially in formation of giant mitochondria. *Plant Cell Physiol.* 13, 211-227.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W. und Shaw, J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 143, 333-349.
- Palade, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* 1, 188-211.
- Park, S., Hanekamp, T., Thorsness, M.K. und Thorsness, P.E. (2006). Yme2p is a mediator of nucleoid structure and number in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 50, 173-182.
- Partikian, A., Olveczky, B., Swaminathan, R., Li, Y. und Verkman, A.S. (1998). Rapid diffusion of green fluorescent protein in the mitochondrial matrix. *J. Cell Biol.* 140, 821-829.
- Paul, M.F., Ackermann, S., Yue, J., Arselin, G., Velours, J. und Tzagoloff, A. (1994). Cloning of the yeast *ATP3* gene coding for the gamma-subunit of F1 and characterization of *atp3* mutants. *J. Biol. Chem.* 269, 26158-26164.
- Pendergrass, W., Wolf, N. und Poot, M. (2004). Efficacy of MitoTracker Green and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A* 61, 162-169.
- Perfettini, J.L., Roumier, T. und Kroemer, G. (2005). Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 15, 179-183.
- Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M. und Frey, T. (1997). Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol.* 119, 260-272.
- Perktold, A., Zechmann, B., Daum, G. und Zellnig, G. (2007). Organelle association visualized by three-dimensional ultrastructural imaging of the yeast cell. *FEMS Yeast Res.* 7, 629-638.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R. und McMahon, H.T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495-499.
- Pham, A.H., McCaffery, J.M. und Chan, D.C. (2012). Mouse lines with photo-activatable mitochondria to study mitochondrial dynamics. *Genesis* 50, 833-843.
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A. und Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22, 183-186.

- Praefcke, G.J. und McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 133-147.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. und Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.
- Pröschold, T., Harris, E.H. und Coleman, A.W. (2005). Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 170, 1601-1610.
- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y. und Bretscher, A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 559-591.
- Rafelski, S.M., Viana, M.P., Zhang, Y., Chan, Y.H., Thorn, K.S., Yam, P., Fung, J.C., Li, H., Costa, L. da F. und Marshall, W.F. (2012). Mitochondrial network size scaling in budding yeast. *Science* 338, 822-824.
- Randolph-Anderson, B.L., Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Johnson, A.M., Dorthu, M.P. und Matagne, R.F. (1993). Further characterization of the respiratory deficient *dum-1* mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol. Gen. Genet.* 236, 235-244.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. und Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 20150-20155.
- Remacle, C., Duby, F., Cardol, P. und Matagne, R.F. (2001). Mutations inactivating mitochondrial genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 442-446.
- Ren, M., Phoon, C.K. und Schlame, M. (2014). Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* 55, 1-16.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.
- Rolland, S.G., Lu, Y., David, C.N. und Conradt, B. (2009). The BCL-2-like protein CED-9 of *C. elegans* promotes FZO-1/Mfn1,2- and EAT-3/Opa1-dependent mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 186, 525-540.
- Sager, R. und Granick, S. (1953). Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardi*. *Ann. N Y Acad. Sci.* 56, 831-838.
- Santel, A. und Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114, 867-874.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science* 283, 1488-1493.
- Sato, A., Nakada, K. und Hayashi, J. (2006). Mitochondrial dynamics and aging: Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 473-481.
- Schapira, A.H. (2006). Mitochondrial disease. *Lancet* 368, 70-82.
- Schapira, A.H. (2008). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* 33, 2502-2509.
- Scheffler, I.E. (2001). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1, 3-31.
- Scheffler, I.E. (2008). Mitochondria. 2nd ed., John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, USA.
- Scholz, D., Förtsch, J., Böckler, S., Klecker, T. und Westermann, B. (2013). Analyzing membrane dynamics with live cell fluorescence microscopy with a focus on yeast mitochondria. *Methods Mol. Biol.* 1033, 275-283.
- Scholz, D. und Westermann, B. (2013). Mitochondrial fusion in *Chlamydomonas reinhardtii* zygotes. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 80-86.
- Schon, E.A. und Przedborski, S. (2011). Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* 70, 1033-1053.
- Schwimmer, C., Rak, M., Lefebvre-Legendre, L., Duvezin-Caubet, S., Plane, G. und di Rago, J.P. (2006). Yeast models of human mitochondrial diseases: from molecular mechanisms to drug screening. *Biotechnol. J.* 1, 270-281.
- Sesaki, H. und Jensen, R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* 147, 699-706.

- Sesaki, H. und Jensen, R.E. (2001). *UGO1* encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 152, 1123-1134.
- Sesaki, H. und Jensen, R.E. (2004). Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J. Biol. Chem.* 279, 28298-28303.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E. und Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567-1572.
- Shaw, J.M. und Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* 12, 178-184.
- Sheahan, M.B., McCurdy, D.W. und Rose, R.J. (2005). Mitochondria as a connected population: ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell dedifferentiation through massive mitochondrial fusion. *Plant J.* 44, 744-755.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350, 3-41.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. und Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223-239.
- Shimomura, O. (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J. Microsc.* 217, 1-15.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B. *et al.* (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13207-13212.
- Sikorski, R.S. und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L. und van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12, 2245-2256.
- Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1994). Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 126, 1361-1373.
- Strack, R.L., Hein, B., Bhattacharyya, D., Hell, S.W., Keenan, R.J. und Glick, B.S. (2009). A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *Biochemistry* 48, 8279-8281.
- Stradalova, V., Stahlschmidt, W., Grossmann, G., Blazikova, M., Rachel, R., Tanner, W. und Malinsky, J. (2009). Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J. Cell Sci.* 122, 2887-2894.
- Stradalova, V., Blazikova, M., Grossmann, G., Opekarova, M., Tanner, W. und Malinsky, J. (2012). Distribution of cortical endoplasmic reticulum determines positioning of endocytic events in yeast plasma membrane. *PLoS One* 7, e35132.
- Strain, J., Lorenz, C.R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G.A., Ta, D.T., Vickery, L.E. und Culotta, V.C. (1998). Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* 273, 31138-31144.
- Swayne, T.C., Zhou, C., Boldogh, I.R., Charalel, J.K., McFaline-Figueroa, J.R., Thoms, S., Yang, C., Leung, G., McInnes, J., Erdmann, R. *et al.* (2011). Role for cER and Mmr1p in anchorage of mitochondria at sites of polarized surface growth in budding yeast. *Curr. Biol.* 21, 1994-1999.
- Tang, X., Germain, B.S. und Lee, W.L. (2012). A novel patch assembly domain in Num1 mediates dynein anchoring at the cortex during spindle positioning. *J. Cell Biol.* 196, 743-756.
- Tieu, Q. und Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 151, 353-366.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K. und Nunnari, J. (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J. Cell Biol.* 158, 445-452.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y. und Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 5, 123-135.
- Tiranti, V., Savoia, A., Forti, F., D'Apolito, M.F., Centra, M., Rocchi, M. und Zeviani, M. (1997). Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum. Mol. Genet.* 6, 615-625.

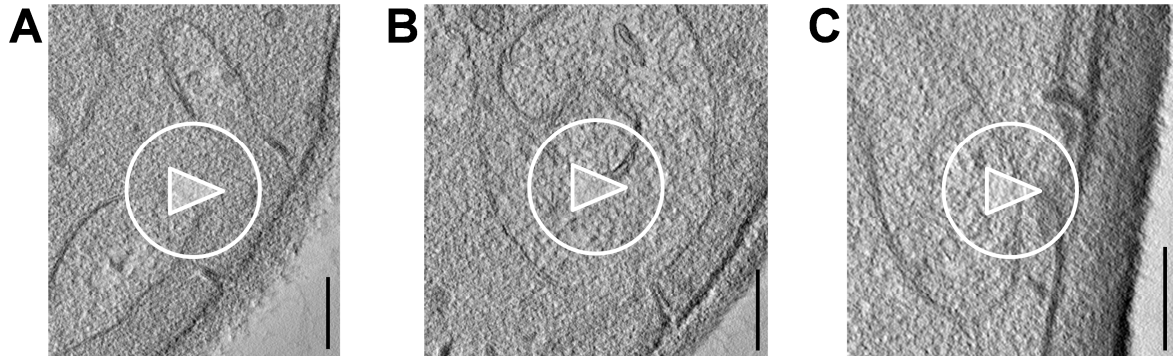


- Tokuyasu, K.T. (1973). A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J. Cell Biol.* 57, 551-565.
- Towpik, J. (2005). Regulation of mitochondrial translation in yeast. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10, 571-594.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G. *et al.* (2008a). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J.* 27, 433-446.
- Twig, G., Hyde, B. und Shirihai, O.S. (2008b). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1092-1097.
- Tzagoloff, A. und Dieckmann, C.L. (1990). PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 54, 211-225.
- van Blerkom, J. (2009). Mitochondria in early mammalian development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 354-364.
- Verkhusha, V.V. und Lukyanov, K.A. (2004). The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat. Biotechnol.* 22, 289-296.
- Visser, W., van Spronsen, E.A., Nanninga, N., Pronk, J.T., Gijs Kuenen, J. und van Dijken, J.P. (1995). Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67, 243-253.
- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W. und Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* 175, 237-247.
- von der Malsburg, K., Müller, J.M., Bohnert, M., Oeljeklaus, S., Kwiatkowska, P., Becker, T., Loniewska-Lwowska, A., Wiese, S., Rao, S., Milenkovic, D. *et al.* (2011). Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev. Cell* 21, 694-707.
- Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M. und Sesaki, H. (2009). The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J. Cell Biol.* 186, 805-816.
- Walhout, A.J., Temple, G.F., Brasch, M.A., Hartley, J.L., Lorson, M.A., van den Heuvel, S. und Vidal, M. (2000). GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods. Enzymol.* 328, 575-592.
- Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantoja, C. und Walter, P. (2006). Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998-1003.
- Warren, G. und Wickner, W. (1996). Organelle inheritance. *Cell* 84, 395-400.
- Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W., Mooyer, P.A., Wanders, R.J. und Leonard, J.V. (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* 356, 1736-1741.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H. und Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.
- Wei, D., Jacobs, S., Modla, S., Zhang, S., Young, C.L., Cirino, R., Caplan, J. und Czymmek, K. (2012). High-resolution three-dimensional reconstruction of a whole yeast cell using focused-ion beam scanning electron microscopy. *Biotechniques* 53, 41-48.
- Westermann, B. und Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16, 1421-1427.
- Westermann, B. (2008). Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J. Biol. Chem.* 283, 13501-13505.
- Westermann, B. (2010a). Mitochondrial dynamics in model organisms: What yeasts, worms and flies have taught us about fusion and fission of mitochondria. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 542-549.
- Westermann, B. (2010b). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 872-884.
- Westermann, B. (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1833-1838.
- Westermann, B. (2014). Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1039-1046.

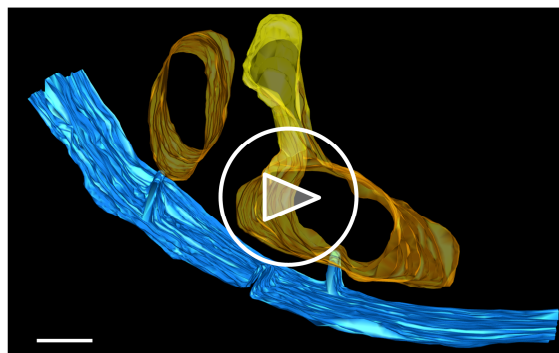
- Wiedemann, N., Frazier, A.E. und Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 14473-14476.
- Wilkens, V., Kohl, W. und Busch, K. (2012). Restricted diffusion of OXPHOS complexes in dynamic mitochondria delays their exchange between cristae and engenders a transitory mosaic distribution. *J. Cell Sci.* 126, 103-116.
- Williamson, D.H. und Fennell, D.J. (1979). Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain "DAPI". *Methods Enzymol.* 56, 728-733.
- Williamson, D. (2002). The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat. Rev. Genet.* 3, 475-481.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H. *et al.* (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285, 901-906.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. und Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* 151, 341-352.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinski, T.J., Cassidy-Stone, A. und Nunnari, J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 160, 303-311.
- Wurm, C.A. und Jakobs, S. (2006). Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett.* 580, 5628-5634.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J. und Woese, C.R. (1985). Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4443-4447.
- Yang, H.C., Palazzo, A., Swayne, T.C. und Pon, L.A. (1999). A retention mechanism for distribution of mitochondria during cell division in budding yeast. *Curr. Biol.* 9, 1111-1114.
- Ylikallio, E. und Suomalainen, A. (2012). Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann. Med.* 44, 41-59.
- Yoon, Y., Galloway, C.A., Jhun, B.S. und Yu, T. (2011). Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 439-457.
- Youle, R.J. und Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 657-663.
- Youle, R.J. und van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 1062-1065.
- Youngman, M.J., Hobbs, A.E., Burgess, S.M., Srinivasan, M. und Jensen, R.E. (2004). Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J. Cell Biol.* 164, 677-688.
- Yu, J.W., Mendrola, J.M., Audhya, A., Singh, S., Keleti, D., DeWald, D.B., Murray, D., Emr, S.D. und Lemmon, M.A. (2004). Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol. Cell* 13, 677-688.
- Zhang, X., Lester, R.L. und Dickson, R.C. (2004). Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J. Biol. Chem.* 279, 22030-22038.
- Zhang, Y. und Chan, D.C. (2007). Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 18526-18530.
- Zhang, C.L., Rodenkirch, L., Schultz, J.R. und Chiu, S.Y. (2012). A novel method to study the local mitochondrial fusion in myelinated axons *in vivo*. *J. Neurosci. Methods* 207, 51-58.
- Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D.W., Abel, P.W. und Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 32, 4814-4824.
- Zick, M., Rabl, R. und Reichert, A.S. (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 5-19.

## 6. Anhang

Die gedruckte Version dieser Arbeit enthält eine CD-ROM mit folgenden Filmen.



**Filme 6-1: Ultrastrukturelle Charakterisierung der mitochondrialen Verankerungspunkte in der Retentionszone der Mutterzelle (Originaldaten zu Klecker *et al.*, 2013).** (A-C) Für diese Experimente wurden WT-Hefen verwendet, die das Plasmid pRS426-Myo2-Fis1 exprimierten. Diese Zellen wurden bis zum logarithmischen Wachstum auf glukosehaltigem Minimalmedium angezogen, nach Standardmethoden in Epon eingebettet und mittels Elektronentomographie analysiert. In den Tomogrammen ist die Region der Mutterzelle abgebildet, welche der Knospe gegenüberliegt. Die dargestellten Tomogramme stammen von unterschiedlichen Zellen und gehören zu den entsprechenden Aufnahmen in Abb. 3-10 A, B und D. Das Tomogramm in (C) ist um 90° nach links gekippt (vgl. Abb. 3-10 D). Jeder Größenmaßstab entspricht 250 nm.



**Film 6-2: Animierte 3D-Rekonstruktion der mitochondrialen Verankerungspunkte am Zellkortex der Mutterzelle.** Die Rekonstruktion wurde auf Grundlage des Tomogramms in Film 5-1 A durch Nachzeichnen der Plasmamembran (blau) und der mitochondrialen Außenmembran (gelb) erstellt. Der Maßstab entspricht 200 nm.



**Film 6-3: Vorhandensein von kortikalem ER an einem mitochondrialen Verankerungspunkt in der Retentionszone der Mutterzelle.** Das Tomogramm wurde auf die zuvor beschriebene Weise angefertigt (Filme 6-1). Das kortikale ER befindet sich direkt zwischen dem Mitochondrium und der Plasmamembran oberhalb der Membraninvagination. Das Tomogramm ist um 90° nach rechts gekippt (vgl. Abb. 3-10 C). Der Größenmaßstab entspricht 200 nm.

## Publikationen

### Folgende Veröffentlichungen entstanden im Rahmen dieser Arbeit:

**Scholz, D.**, und Westermann, B. (2013). Mitochondrial fusion in *Chlamydomonas reinhardtii* zygotes. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 80-86.

**Scholz, D.**, Förtsch, J., Böckler, S., Klecker, T., und Westermann, B. (2013). Analyzing membrane dynamics with live cell fluorescence microscopy with a focus on yeast mitochondria. *Methods Mol. Biol.* 1033, 275-283.

Klecker, T., **Scholz, D.**, Förtsch, J., und Westermann, B. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *J. Cell Sci.* 126, 2924-2930.

## Erklärungen

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

Die Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern wurde bisher nicht und wird auch künftig nicht von mir in Anspruch genommen.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

Bayreuth, den 19.12.2014

---

Dirk Scholz

## Danksagung

Ich bedanke mich bei...

...meinem Doktorvater Prof. Dr. **Benedikt Westermann** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die einwandfreie fachliche Betreuung sowie seine Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotion am Institut für Zellbiologie an der Universität Bayreuth. Danke für viele interessante Erfahrungen und die lehrreiche Zeit.

...den Mitgliedern meines Mentorats, Prof. Dr. **Benedikt Westermann**, Prof. Dr. **Stefan Schuster** und PD Dr. **Stefan Geimer** für die wissenschaftlichen Ratschläge und die hilfreichen Ideen auch außerhalb der planmäßigen Mentorstreffen.

...der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung finanzieller Mittel zur Unterstützung dieser Arbeit.

...all den netten, aktuellen und ehemaligen Laborkollegen für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit im Labor.

...**Christine Leibiger** für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für den Spaß im Labor.

...den Elektronenmikroskopikern: PD Dr. **Stefan Geimer** für sein fachliches Know-how, **Ann-Katrin Unger** und **Michaela Rogowski** für die Einführung in die Techniken der Cryo-Elektronenmikroskopie und Elektronentomographie sowie **Rita Grotjahn** für die Bereitstellung einiger Puffer und Lösungen in der Elektronenmikroskopie.

...**Annette Suske** für ihre Übersicht in allen organisatorischen Belangen und ihren Einsatz für einen reibungslosen Laboralltag sowie die gelegentliche Unterstützung bei der Anzucht der Algenkulturen.

...**Petra Helies** für den unermüdlichen Einsatz in der Spülküche, ihre Hilfsbereitschaft und die gesamte moralische Unterstützung. Sie hatte immer ein offenes Ohr und brachte viel Spaß ins Labor.

...**meiner gesamten Familie** für den bedingungslosen Rückhalt in allen Lebenslagen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. **Annegret Hampel** nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ich danke Dir für Deine uneingeschränkte Unterstützung, Deine unendliche Geduld und Deine Liebe. Danke für Alles!